



(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 198 595 B1

(12)

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:

05.11.2003 Bulletin 2003/45

(21) Numéro de dépôt: 00962576.5

(22) Date de dépôt: 05.09.2000

(51) Int Cl.7: C12Q 1/68

(86) Numéro de dépôt international:
PCT/FR00/02439

(87) Numéro de publication internationale:
WO 01/020027 (22.03.2001 Gazette 2001/12)

(54) METHODES ET COMPOSITIONS POUR LA DETECTION D'EVENEMENTS PATHOLOGIQUES

VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNG ZUR DETEKTION PATHOGENER ZUSTÄNDE

METHODS AND COMPOSITIONS FOR DETECTING PATHOLOGICAL EVENTS

(84) Etats contractants désignés:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorité: 16.09.1999 FR 9911563

(43) Date de publication de la demande:
24.04.2002 Bulletin 2002/17

(60) Demande divisionnaire:
03017827.1

(73) Titulaire: Exonhit Therapeutics S.A.
75013 Paris (FR)

(72) Inventeurs:

- TOCQUE, Bruno
F-92400 Courbevoie (FR)
- BRACCO, Laurent
F-75014 Paris (FR)
- SCHWEIGHOFFER, Fabien
F-94300 Vincennes (FR)

(74) Mandataire: Becker, Philippe et al
Cabinet Becker & Associés
35, rue des Mathurins
75008 Paris (FR)

(56) Documents cités:

WO-A-99/46403

- TRÖSTER H ET AL.: "One gene, two transcripts: Isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-B from a cDNA library of a patient with primary Sjögren's syndrome" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 180, 1994, pages 2059-2067, XP000925381
- DIATCHENKO L ET AL: "SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION: A METHOD FOR GENERATING DIFFERENTIALLY REGULATED OR TISSUE-SPECIFIC cDNA PROBES AND LIBRARIES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 93, 1 juin 1996 (1996-06-01), pages 6025-6030, XP002911922 ISSN: 0027-8424
- SPILSBURY K ET AL.: "Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential cDNA analysis" BLOOD, vol. 85, no. 6, 1995, pages 1620-1629, XP000925451

Remarques:

Le dossier contient des informations techniques présentées postérieurement au dépôt de la demande et ne figurant pas dans le présent fascicule.

EP 1 198 595 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

[0001] La présente invention concerne de nouvelles compositions et méthodes pour la détection d'événements pathologiques. Elle concerne plus particulièrement des compositions et méthodes de détection d'événements pathologiques à distance. L'invention concerne également des outils, kits et compositions pour la mise en oeuvre de telles méthodes, ainsi que leurs utilisations dans le domaine de la santé humaine ou animale, ou en recherche expérimentale par exemple.

[0002] Avec le vieillissement de la population dans les pays industrialisés, apparaissent de nouveaux besoins en matière de diagnostic. Les maladies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives seraient mieux prises en charge pour le bénéfice des patients et de la société si l'on disposait de diagnostics prédictifs de l'apparition et de l'évolution de la pathologie.

[0003] L'expérience montre que plus le diagnostic est posé précocement plus les chances de contrôler l'évolution probable de la maladie sont grandes. C'est le cas, très clairement des cancers. Les campagnes de détection précoce des cancers du sein par mammographie systématique ont permis d'améliorer l'espérance de survie à ces cancers. De même, on peut supputer qu'une prise en compte précoce des patients développant une maladie d'Alzheimer permettrait de ralentir significativement son évolution.

[0004] Ces maladies, telles les cancers et maladies neurodégénératives, ont une incidence qui augmente fortement avec l'âge de la population. Il est probable que ces maladies prennent des années avant de s'installer et de pouvoir être détectées. Il ressort par exemple que l'accumulation d'altérations successives au niveau du génome humain est requise pour aboutir à l'initiation de cancers. De même des études génétiques réalisées dans des populations choisies présentant une incidence forte de maladie d'Alzheimer, associées à des expériences de génétique chez l'animal, soulignent également le caractère multifactoriel de l'initiation de cette pathologie.

[0005] Ces pathologies liées au vieillissement présentent des caractéristiques communes, telles que :

- des altérations cellulaires survenant à la suite de déséquilibres de l'environnement des tissus incriminés liés à des agressions physiques, chimiques ou biologiques ;
- la contribution des cellules du système immunitaire.

[0006] Si les altérations des tissus incriminés ne sont préférentiellement identifiées qu'à la suite de biopsies, il se pourrait que des altérations des cellules immunitaires, reflet d'un développement pathologique en cours, puissent être détectées à distance des foyers de développement de ces pathologies, puisque la plupart des cellules du système immunitaire évoluent entre les tissus et le compartiment sanguin ou les ganglions lym-

phatiques.

[0007] Les cellules lymphocytaires et les macrophages sont les principaux médiateurs de la réponse immunitaire cellulaire. Lymphocytes et macrophages sont présents dans les tissus ainsi que dans le sang. Ce sont ces cellules qui entrent les premiers en contact avec les tissus étrangers à l'organisme. Ces cellules macrophagiques dégradent les tissus et substances incriminés. Les peptides issus des protéines dégradées sont ensuite fixés par des molécules du système majeur d'histocompatibilité de classe II qui les amènent à la surface du macrophage où ces complexes sont reconnus par les lymphocytes T. D'autres systèmes de présentation de peptides et d'activation des réponses immunitaires existent et ont été décrits notamment dans le cas du développement de cancers.

[0008] Aujourd'hui les diagnostics de ce type de maladies sont faits alors que la pathologie est installée. Pour ce qui est des cancers, par exemple, le diagnostic est posé à partir d'une imagerie médicale et d'un diagnostic morphologique des tissus obtenus à la suite de biopsies. Pour une pathologie comme la maladie d'Alzheimer c'est un faisceau d'observations médicales qui permet de poser le diagnostic.

[0009] Il existe donc un réel besoin de disposer d'outils et de méthodes permettant de dépister de manière précoce, simple et fiable l'apparition de pathologies, notamment de pathologies liées à un dérèglement des mécanismes de régulation des voies de signalisation cellulaire, en particulier des pathologies caractérisées par une hyper-prolifération cellulaire (cancer, dégénérescence nerveuse, sténose, etc).

[0010] L'introduction des techniques issues de la biologie moléculaire, associée à la bio-informatique, a permis de concevoir des librairies (ou banques) de fragments d'ADN caractérisant un état pathologique donné, permettant de déterminer à partir d'un échantillon très petit d'un tissu quelconque, la présence ou l'absence de références pathologiques.

[0011] La présente invention décrit à présent une nouvelle approche pour la détection de pathologies *in vitro*. Plus particulièrement, la présente invention décrit de nouvelles méthodes et compositions pour la détection d'événements pathologiques, notamment de signatures génétiques pathologiques. L'invention décrit en outre des méthodes et compositions utilisables pour la détection à distance d'événements pathologiques, c'est-à-dire sur des matériaux biologiques distincts des tissus pathologiques. Les compositions et méthodes de l'invention offrent à présent aux cliniciens, biologistes et industriels de nouvelles solutions pour le diagnostic *in vitro*, fondées sur des méthodes directes, rapides, sensibles et économiques, et automatisables.

[0012] Plus particulièrement, la présente invention repose notamment sur la mise en évidence qu'il est possible de déterminer, à partir d'échantillons biologiques comprenant des cellules circulantes, la présence ou le risque de développement d'une pathologie. Plus parti-

culièrement, l'invention repose sur la mise en évidence qu'il est possible de détecter dans un échantillon biologique comprenant des cellules sanguines, l'existence d'une pathologie, y compris à des stades très précoce d'initiation ou de développement, auxquels tout autre diagnostic existant serait inefficace.

[0013] Un premier objet de l'invention réside plus particulièrement dans un procédé de détection *in vitro* de la présence d'une pathologie chez un sujet, selon la revendication 1.

[0014] Plus préférentiellement, le procédé de l'invention comprend la détermination de la présence, dans l'échantillon, de cellules sanguines présentant des altérations de l'expression génétique caractéristiques de la présence de la pathologie.

[0015] Ainsi, la présente invention repose d'une part sur l'utilisation de cellules sanguines pour la réalisation d'un test à distance de la présence d'un événement pathologique et, d'autre part, sur l'utilisation de technologies génomiques permettant de détecter des altérations de l'expression (en particulier de la transcription) du génome dans ces cellules.

[0016] Selon une variante particulière, la présente invention comprend donc plus préférentiellement la détermination de la présence, dans un échantillon biologique, de cellules sanguines présentant des altérations transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles de l'expression génétique, caractéristiques de la présence d'une pathologie.

[0017] L'invention réside en la démonstration qu'il est possible de détecter une pathologie en cours de formation à partir de signatures génomiques identifiées dans les cellules sanguines, les foyers embryonnaires pathologiques pouvant exister dans des tissus nerveux comme le cerveau ou la moelle épinière (sites de maladies neurodégénératives) ou dans tout autre tissu par exemple à l'origine d'un cancer (sein, poumon, prostate, foie, tissu osseux etc.).

[0018] L'invention démontre d'une manière inattendue qu'il existe au niveau des cellules sanguines (préférentiellement des cellules nucléées, telles que lymphocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques, etc.) des altérations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de l'expression génétique à la suite d'interaction(s) directe(s) ou indirecte(s) avec les cellules en cours d'initiation pathologique.

[0019] Plus particulièrement, l'invention démontre d'une manière inattendue qu'il existe au niveau des cellules sanguines (préférentiellement des cellules nucléées, lymphocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques, etc.) des altérations de la transcription qualitatives des gènes à la suite d'interaction(s) directe(s) ou indirecte(s) avec les cellules en cours d'initiation pathologique.

[0020] Plus particulièrement, dans un mode de mise en oeuvre de l'invention, la banque utilisée comprend en outre des acides nucléiques spécifiques de gènes dont le niveau d'expression est modifié dans une cellule

sanguine provenant d'un organisme présentant une situation pathologique.

[0021] L'invention est basée notamment sur une méthode originale, l'analyse qualitative des différences liées à la présence d'insertions ou de délétions (épissages alternatifs) dans des régions essentielles pour la fonction des produits des gènes. Ces insertions et délétions sont précisément régulées et sont caractéristiques des états physiologiques et physiopathologiques (notamment prolifératifs et différenciés) des cellules de l'organisme. Ce niveau de régulation est affecté au cours de l'initiation, du maintien et du développement d'un grand nombre de pathologies. Dans un mode préféré, l'invention réside donc aussi dans l'application d'une technologie génomique destinée à analyser systématiquement ces dérégulations à la mise au point de diagnostics prédictifs. L'invention permet ainsi d'identifier les gènes dérégulés dans des cellules circulantes lors d'événements pathologiques, et d'utiliser ces événements génétiques qualitatifs dans des tests diagnostiques, prédictifs ou de détection d'événements pathologiques, qui contribuent à la maîtrise globale des dépenses de santé.

[0022] Dans la perspective d'identifier des marqueurs d'expression génétique spécifiquement présents dans les cellules sanguines d'un organisme présentant une pathologie, par exemple à un stade trop précoce pour pouvoir être diagnostiqués par examens cliniques ou tests diagnostics classiques, la présente invention propose avantageusement d'identifier des altérations post-transcriptionnelles. En effet ces altérations sont principalement la conséquence de la modification de la régulation d'une étape-clé de l'expression génique : l'épissage. Les variations d'épissage modifient de façon qualitative les ARN en incluant ou en excluant de ceux-ci des exons ou introns dont la présence ou l'absence liée à une situation physiopathologique donnée peut fournir la base pour un diagnostic. Ce diagnostic peut être basé sur l'utilisation de PCR ou d'hybridations qui permettent de détecter spécifiquement la séquence épissée de façon différentielle entre les deux situations. Souvent les variations d'épissage, par utilisation d'exon(s) alternatif(s) ou par rétention d'intron(s) dans un ARN messager affectent la séquence de la protéine correspondante.

[0023] Ces différences dans l'enchaînement d'acides aminés permettent d'envisager un diagnostic basé sur l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement la séquence protéique alternative.

[0024] Comme indiqué ci-dessus, le procédé de l'invention repose notamment sur l'utilisation de cellules circulantes comme matériel biologique. Plus particulièrement, il s'agit de cellules sanguines, et de préférence de cellules nucléées. On peut citer notamment les lymphocytes, macrophages, monocytes, cellules dendritiques, etc. Ces cellules peuvent être prélevées chez un sujet par toute technique connue de l'homme du métier, cytophérèse, gradients Ficoll, préparation de cellules mononucléées du sang périphérique, etc. Pour la mise

en oeuvre de la présente invention, les différentes populations de cellules sanguines peuvent être séparées les unes des autres, pour n'utiliser qu'un type particulier, présentant une signature génomique spécifique. Toutefois, le test de l'invention peut également être réalisé sur un échantillon biologique comprenant de cellules sanguines non séparées. Par ailleurs, les cellules circulantes peuvent également être (ou comprendre) des cellules tumorales, détachées du tissu pathologique, par exemple dans le cas de processus de métastases. Les acides nucléiques peuvent être préparés de l'échantillon selon toute technique connue de l'homme du métier (lyse cellulaire, extraction, isolement des ARN, etc.). En outre, ces acides nucléiques sont préférentiellement traités préalablement à l'étape d'hybridation, par exemple pour produire de ADNc, pour amplifier ces acides nucléiques, pour les marquer, etc. A cet égard, le marquage peut être par exemple radioactif, enzymatique, fluorescent, colorimétrique, ou de toute autre nature. Typiquement, le procédé de l'invention comprend le prélevement d'un échantillon biologique sanguin, le traitement des cellules sanguines pour libérer les acides nucléiques, l'amplification des acides nucléiques (et, le cas échéant, leur transcription inverse), le marquage des acides nucléiques et leur hybridation sur la ou les banques.

[0024] Le procédé de l'invention peut être utilisé pour détecter la présence d'une pathologie (ou d'un événement pathologique), c'est-à-dire l'existence de mécanismes cellulaires caractéristiques d'une situation d'initiation ou de développement d'une pathologie, même si les symptômes cliniques ne sont pas encore apparents. Le procédé de l'invention peut à cet égard permettre également la détection *in vitro* du stade d'évolution d'une pathologie chez un sujet. Ainsi, les signatures génétiques des cellules évoluent en fonction du stade d'avancement de la pathologie, et il est possible de détecter, grâce à des banques spécifiques, l'évolution d'une pathologie. D'autre part, le procédé de l'invention permet aussi de détecter *in vitro* la localisation d'une pathologie chez un sujet, c'est-à-dire par exemple l'origine tissulaire du foyer pathologique.

[0025] Comme indiqué ci-dessus, le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre pour détecter différents types de pathologies, notamment des pathologies associées à des dérégulations des voies de signalisations cellulaires. Il peut s'agir de pathologies liées au vieillissement, comme par exemple les maladies neurodégénératives, ou de toute autre pathologie impliquant notamment une prolifération cellulaire anormale (cancer, sténose, etc.).

[0026] Selon un mode particulier, l'invention concerne un procédé tel que défini ci-dessus pour la détection *in vitro* de la présence, du stade d'évolution et/ou de la localisation d'une pathologie neurodégénérative.

[0027] Selon un autre mode particulier, l'invention concerne un procédé tel que défini ci-dessus pour la détection *in vitro* de la présence, du stade d'évolution et/ou de la localisation d'une pathologie cancéreuse. Il peut s'agir de cancers variés, comme par exemple de tumeurs solides (hépatiques, pulmonaire, tête et cou, mélanome, foie, vessie, sein, etc.).

5 [0028] L'invention décrit également un procédé de détection *in vitro* de cellules sanguines caractéristiques d'un état pathologique, comprenant le prélèvement d'un échantillon de cellules sanguines chez un sujet et la détermination de la présence, dans cet échantillon, de cellules sanguines présentant un profil génétique caractéristique d'une pathologie.

10 [0029] Comme décrit ci-dessus, l'invention repose en partie sur la constitution et l'utilisation de banques d'acides nucléiques caractéristiques d'un état pathologique. 15 Dans un premier mode de réalisation, il s'agit de banques (ou de préparations) d'acides nucléiques, comprenant des acides nucléiques spécifiques de gènes dont le niveau d'expression est modifié dans une cellule sanguine provenant d'un organisme dans une situation pathologique.

20 [0030] Selon un autre mode de réalisation, il s'agit de banques (ou de préparations) d'acides nucléiques comprenant des acides nucléiques spécifiques de formes d'épissages de gènes, caractéristiques d'une cellule sanguine provenant d'un organisme dans une situation pathologique.

25 [0031] Les préparations et banques de l'invention peuvent être déposées sur des supports, affinées et mélangées, comme il sera décrit plus en détails dans la suite du texte.

30 [0032] L'invention décrit encore des méthodes pour la préparation de telles banques. En particulier, ces méthodes comprennent (i) l'obtention d'une première préparation d'acides nucléiques à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide, (ii) l'obtention d'une préparation d'acides nucléiques de référence à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme ne présentant pas ladite pathologie, (iii) une étape d'hybridation entre ladite première préparation et la préparation de référence, et (iv) la récupération, à partir des hybrides formés, de clones d'acides nucléiques spécifiques de formes d'épissages de gènes caractéristiques de la cellule sanguine provenant de l'organisme en situation de pathologie.

35 [0033] L'invention décrit également des procédés de préparation de banques d'acides nucléiques caractéristiques du stade d'évolution d'une pathologie, comprenant (i) l'obtention d'une première préparation d'acides nucléiques à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide à un stade d'évolution déterminé, (ii) l'obtention d'une préparation d'acides nucléiques de référence à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant ladite pathologie à un stade d'évolution différent, (iii) une étape d'hybridation entre ladite première préparation et la préparation de référence, et (iv) la récupération, à partir des hybrides formés, de clo-

nes d'acides nucléiques spécifiques de formes d'épisages de gènes caractéristiques de la cellule sanguine provenant de l'organisme au stade d'évolution déterminé de la pathologie.

[0034] Comme il sera expliqué en détails plus loin, l'étape de récupération des clones peut comprendre soit la récupération des clones d'acides nucléiques non hybrides, soit la récupération, à partir des hybrides formés, de clones d'acides nucléiques spécifiques de formes d'épisages de gènes.

[0035] L'invention concerne également tout kit utilisable pour la mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-avant comprenant une banque d'acides nucléiques comprenant des acides nucléiques spécifiques d'altérations d'expression génétique caractéristiques de cellules sanguines d'un organisme en situation pathologique.

Identification de marqueurs spécifiques des modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles

[0036] Comme indiqué ci-avant, l'invention décrit des procédés de préparation de banques d'acides nucléiques caractéristiques du stade d'évolution d'une pathologie, comprenant (i) l'obtention d'une première préparation d'acides nucléiques à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie à un stade d'évolution déterminé, (ii) l'obtention d'une préparation d'acides nucléiques de référence à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant ladite pathologie à un stade d'évolution différent, (iii) une étape d'hybridation entre ladite première préparation et la préparation de référence, et (iv) la récupération des acides nucléiques caractéristiques de la cellule sanguine provenant de l'organisme au stade d'évolution déterminé de la pathologie.

[0037] Les méthodes de l'invention comprennent plus particulièrement la constitution de clones et de banques d'acides nucléiques à partir d'ARN(s) extraits de différentes pathologies, à différents stades de leur progression, et obtenues aussi bien à partir de tissus pathologiques que des cellules sanguines dont l'expression génétique a été affectée par ces tissus. L'obtention de ces clones et de ces banques se fait avantageusement par des techniques d'analyses différentielles de l'expression génétique. Les signatures différentielles obtenues sont donc spécifiques de différences entre tissu malade et tissu sain d'une part et cellules sanguines de malade et cellules sanguines de témoin sain d'autre part. Ces signatures peuvent donc être exprimées préférentiellement soit dans les échantillons pathologiques soit dans les échantillons contrôles.

[0038] Les populations d'acides nucléiques servant à l'obtention de clones ou à la constitution de banques sont par exemple des ARN (totaux ou messagers) des cellules extraits d'une situation pathologique et des ARN (totaux ou messagers) correspondant à une situa-

tion contrôle, ou des acides nucléiques dérivés des ces ARN totaux ou messagers (par transcription inverse, amplification, clonage dans des vecteurs, etc.). Ces acides nucléiques peuvent être préparés selon les techniques connues de l'homme du métier. brièvement, ces techniques comprennent généralement une lyse des cellules, tissu ou échantillon, et l'isolement des ARN par des techniques d'extraction. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques

5 tels que le thiocyanate de guanidium (qui détruit les cellules et protège les ARN) suivi d'une extraction des ARN au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. 10 Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce tels que par exemple le kit US73750 (Amersham) pour les ARN totaux. Il n'est pas nécessaire que les ARN utilisés soient parfaitement purs, et notamment il n'est pas gênant que des traces d'ADN génomique ou d'autres composants cellulaires (protéine, etc.) subsistent dans les préparations, dès lors qu'ils n'affectent pas significativement la stabilité des ARNs. En outre, de manière facultative, il est possible d'utiliser non pas des préparations d'ARN totaux mais des préparations d'ARN messagers. Ceux-ci peuvent être isolés, soit directement à partir de l'échantillon biologique soit à partir des ARN totaux, au moyen de séquences polyT, selon les méthodes classiques. L'obtention d'ARN messagers 15 peut à cet égard être réalisée au moyen de kits commerciaux tels que par exemple le kit US72700 (Amersham). Les ARN peuvent également être obtenus directement à partir de banques ou autres échantillons préparés à l'avance et/ ou accessibles dans des collections, conservés dans des conditions appropriées.

[0039] L'hybridation peut être réalisée dans différentes conditions, qui peuvent être ajustées par l'homme du métier. De préférence, on utilise pour l'hybridation un excès de la population d'acides nucléiques dérivés de

20 la situation de dérégulation par rapport à la population d'acides nucléiques dérivés de la situation de contrôle.

[0040] A partir du produit de la réaction d'hybridation, deux types principaux d'approches peuvent être utilisés pour isoler les clones caractéristiques de dérégulations (pathologiques) selon l'invention. La première, purement quantitative, permet de générer une préparation d'acides nucléiques regroupant l'ensemble (ou une part significative) des clones résultant d'une différence de niveau d'expression entre les deux situations. De tels clones (et banques) sont obtenus selon les techniques connues d'hybridation soustractive, consistant essentiellement à éliminer les hybrides formés lors de l'étape d'hybridation, pour ne conserver que les clones non hybrides, caractéristiques de la situation de dérégulation 25 par rapport à la situation de contrôle choisie.

[0041] Dans un mode préféré de mise en oeuvre, on utilise cependant un procédé qualitatif, qui permet de générer une préparation d'acides nucléiques regrou-

part l'ensemble (ou une partie importante) des clones résultant d'altérations génétiques fonctionnelles caractéristiques de la situation de dérégulation par rapport à la situation de contrôle choisie. Plus particulièrement, une telle banque qualitative comprend non pas l'ensemble des clones dont l'expression est modifiée, mais par exemple les clones correspondant à des épissages ou à des délétions différentielles entre les deux situations. Compte tenu du rôle des épissages alternatifs dans les voies de régulation et de transformation cellulaires, de telles préparations (et banques) comportent avantageusement des clones ayant une valeur fonctionnelle importante, et donc susceptibles de refléter des modifications génétiques impliquées dans la situation de dérégulation. De tels clones permettent donc de constituer des banques plus prédictives et de générer des marqueurs génétiques plus représentatifs.

La constitution de telles banques qualitatives peut être réalisée par isolement, à partir des hybrides formés lors de l'étape d'hybridation, des régions d'acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels ou à des délétions. Selon les méthodes employées, ces régions correspondent soit aux régions non appariées, soit aux régions appariées.

[0042] Ces deux approches sont décrites plus en détails dans ce qui suit.

Production et utilisation de banques différentielles quantitatives

[0043] Dans un premier mode de mise en oeuvre, on utilise donc dans la présente invention une banque différentielle quantitative, c'est à dire une banque comprenant des clones d'acides nucléiques correspondant à des gènes dont le niveau d'expression est modifié dans des cellules en situation pathologique par rapport à une situation contrôle. De telles banques peuvent être issues par exemple d'analyses différentielles quantitatives, et regrouper les séquences dont l'expression est augmentée ou diminuée lors de phénomènes de dérégulation cellulaire. Les méthodologies pour établir ce type de banque sont connues de l'homme de métier et peuvent être regroupées dans les catégories suivantes :

Soustraction électronique à partir de Séquençage à Haut Flux

[0044] Ce procédé est basé sur le séquençage aléatoire d'un certain nombre de cDNAs. Un moteur de recherche informatique peut ensuite être utilisé pour effectuer une soustraction entre deux situations analysées.

« Serial Analysis of Gène Expression (SAGE) »

[0045] Ce procédé est basé sur la reconnaissance d'une signature associée à chaque cDNA en utilisant

des enzymes de restriction et des oligonucléotides adaptateurs. Cette étiquette correspond à une partie de la séquence du cDNA (longue de 10 nucléotides afin d'identifier de façon non ambiguë le cDNA correspondant). Ces étiquettes sont ensuite assemblées pour être séquencées puis analysées (Velculescu et coll., *Science*, 1995, 270 :484-487). Cette approche représente donc un raccourci vis-à-vis du séquençage systématique.

« Nucleic Acid Arrays »

[0046] Cette méthode repose sur le dépôt d'acides nucléiques (oligonucléotides, fragments PCR, cDNAs) sur supports solides (membranes, plaques de verre, bio-puces) à plus ou moins haute densité. Des sondes provenant d'ARN messagers d'échantillons sains ou pathologiques sont ensuite utilisées pour hybridation afin d'identifier les messagers qui sont ou bien sur-exprimés ou bien réprimés.

« Differential Display »

[0047] Cette technique utilise une amorce oligo-dT et des amorces aléatoires pour réaliser des réactions PCR sur des populations d'ADNc. Les produits de PCR sont alors comparés sur des gels très résolutifs. Les fragments exprimés de façon différentielle sont ensuite isolés et leur présence est confirmée par Northern-bLOTS avant séquençage.

Plusieurs variantes de cette technologie ont été développées (Prashar et Weissman, *PNAS*, 1996, 93 : 659-663). Ces variantes diffèrent par leur amorces et par le choix des enzymes de restriction et des adaptateurs utilisés. Comme la technologie SAGE, elles s'adressent aux extrémités 3' des cDNAs. Plusieurs kits sont également disponibles sur le marché afin de rendre accessible cette approche.

Clonage par soustraction

[0048] Cette technique est basée sur l'élimination de cDNAs communs à deux échantillons que l'on désire comparer. Ainsi, différents kits de soustraction dans lesquels le cDNA 'tester' est hybridé à un excès de cDNA 'driver' sont proposés (Clontech). Le produit final est constitué d'un pool de fragments amplifiés par PCR dérivé des cDNAs exprimés de façon différentielle, qui peut être cloné dans un vecteur approprié pour analyse ultérieure. La technologie RDA (Representational Difference Analysis) est également basée sur ce principe de soustraction (Lisitsyn et coll., *Science*, 1993, 259 : 946-951).

[0049] La mise en oeuvre de ces techniques d'analyses différentielles permet donc de générer des clones et des banques quantitatifs, c'est-à-dire regroupant l'ensemble des séquences dont l'expression est augmentée ou diminuée lors de phénomènes de dérégulation

(s) cellulaire(s) impliqués dans des pathologies.

Production et utilisation de banques qualitatives différentielles

[0050] Dans un autre mode de mise en oeuvre, on utilise avantageusement dans la présente invention une banque différentielle qualitative, c'est à dire une banque comprenant des clones d'acides nucléiques dont une partie au moins de la séquence correspond à la séquence de gènes épissés différemment entre des cellules correspondant à une situation pathologique et une situation contrôle. Ce type de banque regroupe donc les séquences épissées de manière différentielle lors de processus de dérégulation pathologique.

[0051] L'utilisation de ce type de banque est particulièrement avantageuse. En effet, les différentes voies de signalisation qui sont altérées dans nombre de pathologies, comme les cancers et les maladies neurodégénératives par exemple, impliquent des gènes et donc des ARNm dont l'expression est régulée par épissage alternatif. De plus, un nombre croissant d'exemples fournis par la littérature montre que des formes d'ARN spécifiquement observées en pathologie sont le résultat d'une altération de l'épissage. En relation avec l'originalité de l'invention, il faut souligner aussi que l'état d'activation des différents types cellulaires qui participent à la réponse immunitaire est régulé par des cascades de signalisation dont les acteurs sont régulés par épissage.

[0052] Ainsi, la décence Alzheimer, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson sont autant d'exemples de maladies ayant un réel impact économique et présentant une composante neurodégénérative. Même si la description des symptômes cliniques et l'identification de quelques gènes de susceptibilité ont permis de faire des pas significatifs dans la connaissance de ces maladies, les bases moléculaires soutenant le développement de ces maladies sont toujours très obscures. L'élucidation des cascades de signalisation, dérégulées dans ces états pathologiques, conduira d'une manière indubitable à la découverte de cibles propices à l'intervention diagnostique et thérapeutique. La littérature souligne l'importance des altérations des processus d'épissage des ARN.

- L' Amyotrophie Spinales est l'une des maladies génétiques les plus fréquentes. Deux gènes SMN1 et SMN2 codent pour des protéines identiques, la perte des deux allèles SMN1 et une altération de l'épissage du gène SMN2 concourent au développement de la maladie (Lorson et coll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96 : 6307-6311).
- Dans des biopsies de patients atteints de décence Alzheimer , il a été détecté des altérations spécifiques de l'épissage du gène de présinilline PS1 (Isoe-Wada et coll. Eur. J. Neurol., 1999 : 163-167)
- Le transporteur au glutamate est d'une importance majeure dans des maladies neurodégénératives

comme la Sclérose Amyotrophie Latérale ou l'épilepsie, par exemple. Des altérations de l'épissage de ce transporteur en affectent la fonctionnalité (Meyer et coll . Neurosci. Lett, 1998. 241 : 68-70).

5

[0053] De nombreux exemples d'inactivation d'activité anti-oncogène résultant d'épissages alternatifs des messagers correspondant sont aujourd'hui connus :

- 10 - Dans les carcinomes pulmonaires à petites cellules, le gène de la protéine p130 qui appartient à la famille RB (protéine du rétinoblastome) est muté au niveau d'un site consensus d'épissage. La conséquence de cette mutation est l'élimination de l'exon 2 qui a pour résultat une absence de synthèse de la protéine en raison de la présence d'un codon « stop » précoce. Cette observation a été la première à souligner l'importance des membres de la famille RB dans la tumorigénèse.
- 15 - Dans les cancers de la tête et du cou, l'un des mécanismes d'inactivation de p53 implique une mutation dans un site consensus d'épissage.
- 20 - Dans d'autres types de cancers du poumon, le gène de la protéine p16/INK4A, protéine qui est un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes CDK4 et CDK6 est muté au niveau d'un site donneur d'épissage. Le résultat de cette mutation est la production d'une protéine tronquée à demi-vie courte. Or la protéine p16 s'associe normalement à CDK4 et CDK6, empêchant leur association aux cyclines de type D et la phosphorylation en particulier de RB, ce qui a pour conséquence l'accumulation des formes hypophosphorylées, actives, de RB. En l'absence de p16, RB est inactivée par phosphorylation. Il est à noter que le locus p16 est en fait particulièrement complexe et qu'outre l'expression de p16, il permet celle de p19 par épissage alternatif. La protéine p19 qui n'a aucun acide aminé commun avec la protéine p16, peut s'associer au proto-oncogène MDM2 et bloquer le cycle cellulaire en présence de p53, exerçant ainsi une fonction « suppresseur de tumeur ».
- 25 -
- 30 -
- 35 -
- 40 -
- 45 -
- 50 -
- 55 -
- WT1, anti-oncogène qui code pour un répresseur transcriptionnel dont les altérations sont à l'origine des tumeurs de Wilms, est transcrit en plusieurs ARN messagers engendrés par épissages alternatifs. Dans les cancers du sein, les proportions relatives des différents variants sont modifiées par rapport au tissu sain, fournissant des outils diagnostics et des pistes pour comprendre l'importance des différents domaines fonctionnels de WT1 dans la progression tumorale.
- Ce même phénomène de modification des rapports entre différentes formes d'ARN messagers et d'isoformes protéiques est retrouvé pour la neurofibrine NF1 dans les neurofibromes.
- Cette notion de modulation des phénomènes d'épissage signant la progression tumorale est éga-

lement renforcée par l'exemple de HDM2. Cinq épissages alternatifs de HDM2 sont en effet détectés dans les carcinomes ovariens et pancréatiques et, fait particulièrement intéressant, leur expression augmente selon le stade d'avancement tumoral.

- La LTBP, composant de la matrice extracellulaire de divers tissus intervenant dans la sécrétion et le stockage du TGF- β est aussi produite sous différentes isoformes. L'une d'elle, probablement moins sensible à la protéolyse, semble moduler l'activité biologique du TGF- β et pourrait être impliquée dans différents états physiopathologiques hépatiques.

[0054] Les réponses immunitaires cellulaires et humorales sont sous contrôle transcriptionnel. La littérature fournit des exemples nombreux d'isoformes natives produites par épissage alternatif impliquées dans ces réponses immunitaires.

- les récepteurs « éboueurs » des macrophages sont des glycoprotéines membranaires essentiels aux réponses physiologiques et pathologiques de ces cellules sanguines et leurs fonctions sont régulées par des isoformes générées par épissage (Gough et coll. *J.Lipid Res* ; 1998 ; 39 :531-543.)
- L'activation des lymphocytes T requiert la présence fonctionnelle de plusieurs récepteurs et protéines régulatrices. Boriello et Coll. (*J. Immunol.* 1995 ; 155 :5490-5497) ont rapporté la présence d'isoformes du co-facteur d'activation B7, à la suite d'épissage alternatif de ce gène, soulignant ainsi la grande plasticité de la réponse immunitaire apportée par ces variants d'épissage.

[0055] Tröster et al (*J. Exp. Med.* 180 (1994) 2059) rapporte par ailleurs l'identification d'une forme d'épissage du gène La/SS-B, sans toutefois établir sa corrélation à une pathologie.

[0056] Pour tenir compte de ces phénomènes et de cette complexité, et isoler ainsi des signatures spécifiques d'un état pathologique et présentes dans les cellules sanguines, le procédé de l'invention utilise avantageusement, comme marqueurs génétiques, des événements d'épissages caractéristiques de situations de dérégulation.

[0057] Pour ce faire, la présente invention utilise par exemple des banques d'acides nucléiques qualitatives différentielles produites selon la méthodologie « DATAS » décrite dans la demande de brevet internationale non publiée n° PCT/FR 99/00547. En particulier, de telles banques peuvent être préparées par hybridation entre la population d'acides nucléiques dérivée des cellules isolées de la circulation sanguine à partir de la situation pathologique et la population d'acides nucléiques dérivée des cellules circulantes de la situation de contrôle, et isolément, à partir des hybrides formés, des acides nucléiques correspondant à des épissages différentiels.

[0058] Dans cette approche, l'hybridation est préférentiellement réalisée en phase liquide. En outre, elle peut être effectuée dans tout dispositif approprié, tel que par exemple des tubes (Eppendorf, par exemple), des plaques, ou tout autre support adapté et couramment utilisé en Biologie Moléculaire. L'hybridation est avantageusement réalisée dans des volumes compris entre 10 et 1000 μ l, par exemple entre 10 et 500 μ l. Il est entendu que le dispositif utilisé et les volumes utilisés peuvent être aisément adaptés par l'homme du métier. Les quantités d'acides nucléiques utilisées pour l'hybridation sont également connues de l'homme du métier. En général, il est suffisant d'utiliser des microgrammes d'acides nucléiques, par exemple de l'ordre de 0,1 à 100 μ g. Par ailleurs, il est possible d'utiliser les acides nucléiques dans un rapport driver/tester variant de 50 à 0,02 environ, de préférence de 40 à 0,1. De manière plus particulièrement avantageuse, on préfère que ce rapport soit proche ou supérieur à 1, avantageusement

entre 1 environ et 10 environ. Il est bien entendu que ce rapport peut être adapté par l'homme du métier selon les conditions du procédé (quantités d'acides nucléiques disponibles, situations physiologiques, but pour-suivi, etc.). Les autres paramètres de l'hybridation (temps, température, force ionique) sont également adaptables par l'homme du métier. De manière générale après dénaturation des "tester" et "driver" (par chauffage par exemple), l'hybridation est réalisée pendant environ 2 à 24 heures, à une température de 37°C environ (éventuellement soumise à des sauts de température), et dans des conditions standard de force ionique (pouvant varier de 0,1 à 5M NaCl par exemple). Il est connu que la force ionique est un des facteurs déterminant la stringence d'une hybridation, notamment dans le cas d'hybridation sur support solide.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention, l'hybridation est réalisée en émulsion phénolique, par exemple selon la technique PERT ("Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique) décrite par Kohne D.E. et al. (*Biochemistry*, Vol. 16, N° 24, pp 5329-5341, 1977). Avantageusement, l'hybridation est réalisée en émulsion phénolique maintenue par thermocycles (sauts de température de 37°C environ à 60/65°C environ) et non par agitation, selon la technique décrite par Miller et Riblet (*NAR* 23 (1995) 2339).

[0059] Toute autre technique d'hybridation en phase liquide, de préférence en émulsion, peut être utilisée dans le cadre de la présente invention. Par ailleurs, l'hybridation peut également se faire avec l'un des partenaires immobilisé sur un support. Avantageusement, c'est le driver qui est immobilisé. Cela peut être réalisé notamment grâce à des amores biotinylées ou par toute autre technique d'immobilisation connue de l'homme du métier.

[0060] A partir des populations d'acides nucléiques générées par hybridation, les marqueurs génétiques de l'invention (les clones caractéristiques des altérations génomiques qualitatives) peuvent être identifiés par

toute technique connue de l'homme du métier. Dans le cas des hétéroduplex ARN/ADN, ces régions se présentent essentiellement sous forme de régions d'ARN non-appariées (boucles d'ARN), et peuvent être identifiées et clonées par séparation des hétéroduplex et des acides nucléiques simple-brin (excès d'acide nucléique n'ayant pas réagi), digestion sélective des ARN double-brins (domaines engagés dans les hétéroduplex), puis séparation des ARN simple-brin résultant et des ADN simple-brins. Dans le cas des hétérotriplex, ces régions d'épissages différentiels se présentent essentiellement sous forme de régions d'ADN double-brin et peuvent être identifiées et clonées par traitement en présence d'enzymes appropriées telles qu'une enzyme permettant de digérer les ARN, puis une enzyme permettant de digérer les ADN simple-brin. Les acides nucléiques ainsi obtenus sont directement sous forme d'ADN double-brin et peut être clonés dans tout vecteur approprié.

[0061] Il est entendu que d'autres variantes et conditions précises pour l'isolement des acides nucléiques, les hybridations et l'obtention des clones qualitatifs sont indiquées dans la demande n° PCT/FR99/00547 non encore publiée.

[0062] Ces méthodologies permettent de générer des clones et des banques d'acides nucléiques correspondant à des marqueurs génétiques qualitatifs qui permettent de distinguer les cellules sanguines d'une situation saine de celles d'une situation pathologique. Comme indiqué dans la section expérimentale, ces préparations d'acides nucléiques représentent des marqueurs particulièrement utiles pour diagnostiquer à partir d'un prélèvement sanguin des maladies neurodégénératives et des cancers.

Diversité des banques

[0063] Les méthodologies décrites ci avant permettent donc de générer des ensembles de clones d'acides nucléiques caractéristiques des différences entre situations saine et pathologique. Chaque technique de préparation génère de nombreux clones, constituant des banques. Ces banques peuvent être mises en oeuvre telles quelles, déposées sur des supports ou modifiées par addition ou suppression de clones, regroupement de différentes banques, ajout de clones témoins, etc.

[0064] Les banques de l'invention peuvent comprendre par exemple de 10 à 50 000 clones, plus généralement de 10 à 10 000 clones, encore plus préférentiellement de 50 à 5000 clones. Les clones sont généralement déposés, de façon ordonnée, sur un ou plusieurs supports, de façon à faciliter l'analyse des résultats d'hybridation. Le support peut être en verre, nylon, plastique, fibre, etc., de manière générale tout support solide adapté à l'étalement d'acides nucléiques. Le dépôt des banques sur les supports peut être réalisé par des techniques conventionnelles connues de l'homme du métier, qui sont décrites par exemples dans la demande internationale PCT/FR99/00547.

[0065] Les banques utilisées peuvent comprendre à la fois des clones d'acides nucléiques correspondant à des gènes dont le niveau d'expression est modifié (marqueurs génétiques quantitatifs) et des clones d'acides nucléiques dont une partie au moins de la séquence correspond à des exons ou à des introns épissés de façon différentielle entre une situation saine et une situation pathologique (marqueurs génétiques qualitatifs). Ainsi, les marqueurs génétiques peuvent être générés selon

5 des approches différentes, puis mélangés pour obtenir une réponse aussi prédictive que possible. Il est également possible de réunir au sein d'une même banque, sur un même support, des marqueurs de l'expression génétique exprimés spécifiquement dans les

15 cellules présentes dans la circulation sanguine lors de pathologies différentes. L'hybridation d'une telle banque permet donc un suivi du développement de plusieurs pathologies à partir d'un même prélèvement sanguin. Un objet de la présente invention réside donc également

20 dans une préparation d'acides nucléiques comprenant des marqueurs génétiques qualitatifs et quantitatifs caractéristiques de dérégulation(s) cellulaire(s) présentes dans les cellules de la circulation sanguine et symptomatiques de pathologies. Un objet particulier réside

25 dans une banque comprenant des marqueurs génétiques caractéristiques de différentes situations de dérégulation. L'invention a aussi pour objet tout support solide sur lequel au moins deux banques d'acides nucléiques caractéristiques de deux situations de dérégulation ont été déposées. A cet égard, l'invention concerne

30 encore un procédé de préparation d'une puce à ADN utilisable pour le diagnostic de pathologies, comprenant le dépôt, sur un support solide, d'une ou plusieurs préparations d'acides nucléiques caractéristiques de situation(s) de dérégulation.

[0066] Par ailleurs, selon un mode préféré de mise en oeuvre, on utilise des banques d'acides nucléiques affinées par sélection des clones au fur et à mesure de l'utilisation, en fonction de leur implication effective dans

40 différentes pathologies ou différents stades d'une même pathologie. Les banques initiales peuvent en effet comprendre par exemple l'ensemble des clones caractéristiques des événements génétiques d'une situation de dérégulation consécutive à l'établissement d'une pathologie. Puis, la mise en oeuvre du procédé de diagnostic de l'invention permet d'observer que certains des clones

45 hybrident avec des sondes issues de stades précis et intermédiaires du développement de la pathologie. Ces clones peuvent donc être identifiés comme révélateurs de stades précoces et peuvent fournir un outil diagnostic très puissant capable d'anticiper tout autre critère d'examen clinique, tout autre outil diagnostic.

[0067] De manière plus spécifique, la présente invention décrit à présent l'identification et la caractérisation de tels clones, utilisables comme marqueurs génétiques de la présence et de l'évolution de pathologies.

[0068] L'une des applications majeures de l'identification et du clonage de ces marqueurs génétiques con-

cerne l'évaluation du potentiel hybride des ARN extraits de cellules sanguines d'un individu donné. Cette évaluation peut s'effectuer en hybrideant une sonde représentant les ARN messagers des cellules de cet individu avec une ou plusieurs banques de signatures caractéristiques de situation(s) pathologique(s), telles que décrites ci avant. Cette application est décrite plus en détails dans ce qui suit.

Méthodes d'analyse et de diagnostic des signatures de pathologies

[0069] L'invention permet de déterminer la présence de signatures spécifiques de différents stades de pathologies par hybridation d'un échantillon d'acides nucléiques de cellules présentes dans la circulation sanguine avec les marqueurs génétiques définis ci-dessus, le profil d'hybridation observé indiquant les dérégulations physiopathologiques de l'organisme dont est issu l'échantillon sanguin. Dans ce but, les marqueurs génétiques utilisés sont préférentiellement regroupés sous forme de banques, afin de fournir une réponse aussi prédictive que possible. L'un des avantages de la présente invention réside également dans le nombre important de marqueurs utilisés, qui rend l'information générée d'autant plus prédictive. Le caractère prédictif de l'information est en outre consolidé par la nature des marqueurs utilisés et préparés.

[0070] Un objet particulier de l'invention réside dans une méthode d'analyse du statut des cellules sanguines, comprenant au moins une étape d'hybridation entre a) un échantillon d'acides nucléiques de cellules sanguines et b) une banque d'acides nucléiques correspondant à des événements génétiques caractéristiques de situation(s) de dérégulation(s) de voie(s) de signalisation cellulaire, le profil d'hybridation indiquant les dérégulations physiopathologiques de l'organisme.

[0071] D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la section expérimentale suivante, qui doit être considérée comme illustrative et non limitative.

SECTION EXPERIMENTALE

Exemple de maladies neurodégénératives : ALS

[0072] Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains.

La sclérose amyotrophique latérale (SAL/ALS) est une maladie neurodégénérative, associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewy et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite, coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1

codant pour la superoxyde dismutase. Des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson Laboratory,

5 sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. Ce modèle permet d'avoir accès à des échantillons cérébraux, spinaux et du sang périphérique.

Identification de formes d'épissage spécifique du modèle d'ALS :

20 **[0073]** La société ExonHit Therapeutics développe une approche originale de criblage différentiel qualitatif basée sur la technologie DATAS (Differential Analysis of Transcripts Alternatively Spliced). Cette technologie fait l'objet d'une demande de brevet en Europe et aux

25 Etats-Unis. Les séquences identifiées par DATAS peuvent dériver d'exons alternatifs ou de rétention d'introns dans une des deux situations physiopathologiques comparées. Les données obtenues caractérisent donc des modifications de l'expression de séquences d'ARN

30 qui affectent des domaines fonctionnels de protéines. L'analyse qualitative différentielle est effectuée sur des échantillons d'animaux transgéniques et des contrôles syngéniques âgés de 60 et 100 jours. 60 jours correspondent à un stade qui précède de peu les premiers

35 symptômes, mais qui est déjà caractérisé au niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire, dont notamment une altération du métabolisme mitochondrial. A 100 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif

40 d'apoptose neuronale est engagé parallèlement à une activation astrocytaire.

L'analyse qualitative différentielle est donc effectuée :

45 - à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

50 - à partir de sang total périphérique ou de fractions cellulaires sanguines Les séquences identifiées par DATAS correspondent à des introns et/ou à des exons dont les expressions différentielles par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine sont validées par PCR.

55 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des deux séquences dont l'étude est à poursui-

vre.

Caractérisation ultérieure des séquences obtenues :

[0074] Les séquences validées par PCR peuvent être recherchées dans des modèles complémentaires impliquant des processus de neurodégénération. Ainsi des ARN provenant d'un modèle d'ischémie cérébrale ou des ARN d'un modèle animal de maladie à prions peuvent être utilement étudiés afin de valider l'expression sélective de marqueurs d'ALS ou plus généralement de marqueurs de maladies neurodégénératives.

[0075] L'expression des formes d'épissage identifiées sera recherchée dans des échantillons humains représentatifs de différentes pathologies à composantes neurodégénératives :

- prélèvements sanguins de patients atteints de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, le Parkinson etc..

Exemple de cancer : cancer des voies aériennes et digestives supérieures.

[0076] La transmission de transgènes à fait l'objet de nombreuses applications expérimentales dans le domaine de la cancérologie expérimentale. Ainsi utilise-t-on les allèles dominants de certains gènes cancérogènes pour obtenir des souris transgéniques, alors modèle expérimental pour l'étude du cancer.

Les cancers constituent un groupe hétérogène de maladies caractérisées chacune par un ensemble complexe d'altérations génétiques ayant pour conséquence une prolifération cellulaire anarchique et la dissémination de métastases. Si l'identification des altérations génétiques qui provoquent l'apparition et la progression des cancers apparaît aujourd'hui essentielle pour diagnostiquer et suivre l'évolution tumorale, c'est la perspective d'élaborer de nouveaux diagnostics plus précoce sur la base de cette connaissance qui rend compte de l'importance des enjeux de ces recherches pour l'industrie pharmaceutique. Les gènes dont les altérations peuvent conférer à une cellule des propriétés cancéreuses, sont nombreux. Ils jouent des rôles essentiels non seulement au cours du développement mais aussi tout au long de la vie cellulaire. Ils interviennent ainsi pour assurer des fonctions aussi essentielles que la prolifération, la différenciation, la réparation de l'ADN ou la survie cellulaire. Ceux dont les altérations conduisent à la production de protéines qui activent anormalement le cycle cellulaire sont appelés des oncogènes. On trouve par exemple dans cette catégorie les gènes cellulaires myc et ras. Les anti-oncogènes ont au contraire pour fonction normale de freiner le cycle cellulaire. L'inhibition de leur activité met la cellule sous la seule dépendance des gènes à effet proliférant et favorise donc la progression tumorale. On trouve dans cette catégorie les gènes RB (rétinoblastome) et P53. A coté des on-

cogènes et anti-oncogènes, les gènes modulant la mort cellulaire programmée ou apoptose apparaissent comme des acteurs importants de la cancérogenèse. Assimilable à un processus de différenciation cellulaire physiologique, la mort cellulaire programmée est contrôlée génétiquement. Le fait qu'une cellule ait perdu la capacité d'enclencher cette différenciation terminale qui en permet l'élimination, la met en effet en situation de survie anormale et peut favoriser l'émergence d'un clone

cellulaire transformé. C'est ce que l'on observe dans les lymphomes folliculaires humains où le gène bcl-2 se trouve sur exprimé en raison de la translocation survenue entre les chromosomes 14 et 18. Cette sur-expression d'un gène à activité anti-apoptotique favorise la survie anormalement longue de populations cellulaires au sein desquelles peuvent alors s'accumuler d'autres mutations transformantes. La mort cellulaire programmée ou apoptose est aujourd'hui reconnue comme un mécanisme essentiel à l'élimination de cellules devenues

indésirables qu'il s'agisse de cellules infectées par un virus comme de cellules ayant accumulé des mutations les rendant non fonctionnelles ou anormalement proliférantes. Le niveau de complexité qui régit l'homéostasie cellulaire résulte non seulement du nombre important des acteurs impliqués mais aussi des rôles variés que chacun d'eux peut alternativement jouer en fonction du type cellulaire ou des conditions. L'anti-oncogène p53 ou le proto-oncogène cMyc peuvent par exemple jouer aussi un rôle important dans le contrôle de l'apoptose. Une telle complexité rend nécessaire la mise en œuvre d'approches assez globales pour analyser des modulations d'expression d'ensembles de gènes et suffisamment spécifiques pour, le plus rapidement possible identifier les altérations les plus pertinentes en regard du diagnostic, du suivi de la progression tumorale ou de l'identification de nouvelles cibles d'actions thérapeutiques.

En utilisant différents systèmes d'adressage (régions promotrices) il est possible d'obtenir d'une manière préférentielle l'expression du transgène dans un tissu particulier. On peut ainsi disposer de modèles de tumeurs se développant dans un environnement tissulaire spécifique. Ces différents modèles de tumeurs ciblées laissent entrevoir la possibilité de détecter des signatures spécifiques au niveau des cellules circulantes en fonction de la localisation de la tumeur.

Modèle de tumeur ciblée sur le foie.

[0077] Il existe chez la souris un modèle d'hépatocarcinome (HCC) lié à l'expression restreinte dans le foie des séquences précoces du virus SV40, codant pour les antigènes grand T et petit t (Dubois, N., Bennoun, M., Allemand, I., Molina, T., Grimer, G., Daudet-Monsac, M., Abelanet, R., and Briand, P. (1991) Time course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. *J. Hepatol.*, 13, 227-239). Le transgène est sous le contrôle du promo-

teur du gène humain de l'antithrombine III ce qui entraîne une expression précoce et constante des antigènes viraux. De ce fait, la prolifération hépatocellulaire subit une perturbation en deux temps. L'indice de prolifération des hépatocytes transgéniques est proportionnellement supérieure à la normale pendant le développement hépatique (de la naissance à la 5^{ème} semaine), puis diminue sensiblement sans pour autant atteindre l'indice faible caractéristique de l'état quiescent d'un foie normal. Ces souris transgéniques développent de façon systématique des HCC différenciés conduisant à la mort de tous les animaux avant 7 mois. Malgré une dérégulation précoce de la prolifération des hépatocytes, l'hépatomégalie n'apparaît que tardivement. L'analyse des étapes préneoplasiques précédant l'apparition des HCC a permis de mettre en évidence un mécanisme compensateur par apoptose, maintenant une masse hépatique normale dans ce modèle (Allemand et al., 1995). Il est intéressant de noter que cette apoptose s'arrête au moment même où le foie normal entre dans un état quiescent. Au delà de ce point, il semble que l'homéostasie hépatique ne soit plus contrôlée. Une étude systématique de la sensibilité à l'apoptose a révélé que les hépatocytes dérivés de ce modèle transgénique avaient acquis un caractère résistant à la mort cellulaire dépendante du système CD95/Fas (Rouquet N, Allemand I, Molina T, Bennoun M, Briand P and Joulin V. (1995) Fas-dependent apoptosis is impaired by SV40 T-antigen in transgenic liver. Oncogene, 11, 1061-1067 Rouquet N, Allemand I, Grimber G, Molina T, Briand P and Joulin V. (1996) Protection of hepatocytes from Fas-mediated apoptosis by a non-transforming SV40 T-antigen mutant. cell Death & Diff., 3, 91-96) par un mécanisme indépendant d'un épissage alternatif du récepteur CD95/Fas. Cependant, seule une analyse globale des modifications d'épissage peut rendre compte d'une altération de ce processus pour l'ensemble des partenaires moléculaires intervenant dans la voie de signalisation du récepteur CD95/Fas.

Ce modèle transgénique représente un outil idéal pour identifier 1) les modifications de l'expression génique accompagnant la transition préneoplasie vers néoplasie, que ce soient des gènes indispensables à la transformation (oncogènes) ou des gènes s'opposant à la progression tumorale (gènes apoptotiques) 2) des signatures circulantes du développement du cancer liées à l'échappement à partir de la tumeur de cellules tumorales 3) d'événements d'altération de l'expression génique dans les cellules du sang caractéristiques du développement du cancer.

Identification des signatures spécifiques

[0078] L'approche différentielle qualitative est menée sur des ARN extraits de foie et de cellules du sang de souris normales et de souris développant des hépatocarcinomes (HCC) liés à l'expression de l'antigène T de SV40 sous contrôle du promoteur de l'AntiThrombine III.

Les animaux contrôles et les animaux exprimant le transgène sont choisis à différents âges permettant d'avoir accès aux stades très précoce, préneoplasiques et néoplasiques caractérisés notamment dans ce modèle par une activation puis une inactivation de l'apoptose nécessaire à l'homéostase hépatique.

Utilisation des séquences identifiées

[0079] Les modulations de l'expression de ces séquences pourront être ensuite recherchées dans des biopsies de tumeurs humaines afin d'en élargir le champ d'application, en thérapie humaine et en diagnostic.

Ces ADNc sont utilisés pour suivre l'évolution tumorale dans ce modèle transgénique et dans une série de modèles d'HCC murins produits par transgenèse (Bennoun M, Grimber G, Couton D, Seye A, Molina T, Briand P and Joulin V. (1998) The amino-terminal region of SV40 large T antigen is sufficient to induce hepatic tumours in mice Oncogene, 17, sous presse). Ainsi en utilisant les ADNc spécifiques détectés à différents stades très précoce dans les cellules sanguines, avant l'apparition des tumeurs, on peut prédire dans une population mixte de souris saines et de souris transgéniques, celles qui vont développer un cancer.

Des sondes nucléotidiques ou des amorces de PCR dérivés de ces ADNc spécifiques des tumeurs peuvent être utilisées pour rechercher l'expression, dans des biopsies de tumeurs humaines, des formes d'épissage identifiées et/ou les ARN dont la quantité est altérée dans ce modèle.

De même, les sondes identifiées dans le sang des animaux à différents stades du développement tumoral peuvent être également utilisées afin de détecter des signatures communes avec des prélèvements de sang de patients atteints de cancers.

Dans une stratégie qui utilise des banques d'ADNc obtenues selon les procédés de l'invention décrits plus haut, une sonde totale préparée à partir de prélèvement sanguins de patients atteints de cancer, peut également être utilisée pour la recherche de signatures communes aux différentes banques issues de modèles murins à différents stades du développement tumoral d'une part et à partie de biopsies de différents types tumoraux humains d'autre part. Ces hybridations sont réalisées selon les techniques connues de l'homme de métier (voir notamment les conditions d'hybridation décrites dans la demande PCT/FR99/00547).

RECHERCHE DU DIAGNOSTIC PREDICTIF CHEZ L'HOMME

[0080] La méthodologie décrite dans ce chapitre pourra être mise en oeuvre indifféremment en utilisant les techniques d'analyse quantitative et qualitative décrites ci-avant. L'invention priviliege néanmoins l'utilisation et la recherche de marqueurs liés aux altérations qualitatives de l'expression des gènes en raison des

avantages décrits précédemment.

[0081] L'invention décrit l'identification et la constitution de banques de signatures caractéristiques de l'évolution d'une pathologie à partir de biopsies. Ainsi il est possible d'établir des banques de séquences d'ADNc représentatifs de l'évolution et de la localisation de ces pathologies. Il est donc possible de rechercher, à partir d'un échantillon sanguin, la présence de signatures ADNc identiques à celles présentes dans les banques. La présence de signatures communes souligne alors la présence d'acides nucléiques présentant les mêmes altérations que celles présentes dans les biopsies des pathologies suspectées, très vraisemblablement issues de cellules issues de tissus pathologiques.

[0082] La mise en oeuvre de cette recherche est notamment basée sur la confection de sondes à partir de cellules sanguines et l'hybridation de ces sondes avec des filtres qui regroupent différents marqueurs spécifiques de telle ou telle pathologie.

[0083] L'invention décrit la possibilité d'identifier des altérations de l'expression des gènes à partir de cellules sanguines et ceci à partir de modèles expérimentaux mimant tout ou partie d'une pathologie humaine (exemple modèle de souris ALS ou modèle de tumeur hépatique).

L'utilisation de sondes nucléiques dérivées de cellules sanguines de patients atteints ou non de la pathologie ciblée (maladie neurodégénérative, cancer etc..) permet de rechercher l'existence de signatures communes avec les banques prédictives expérimentales créées à partir des modèles pathologiques expérimentaux. L'apparition de signatures communes constitue un diagnostic d'un risque de développement d'une telle pathologie chez l'individu soumis au diagnostic.

[0084] L'invention permet également de procéder de la manière suivante :

- Des prélèvements sanguins de patients atteints ou non d'une pathologie ciblée sont mélangés afin de constituer un stock d'ARN représentatif des états pathologique et sain.
- Ces ARNs sont soumis à des analyses différentielles selon les techniques décrites dans l'invention et des banques d'ADNc caractéristiques des états pathologiques et sains sont constituées.
- Ces banques d'ADNc sont ensuite validées par hybridation à l'aide de sondes préparées à partir d'échantillons individuels de sang de patients ou de sujets sains.
- Les banques ainsi validées sont ensuite analysées par l'utilisation de sondes préparées à partir de prélèvements de sang d'une large population de sujets consultant un médecin pour des examens de routine. Ces banques constituent un outil diagnostic propre à l'invention. Ainsi un patient effectuant une mammographie pour dépistage d'un cancer du sein, peut être prélevé d'un petit échantillon de sang. Une sonde nucléique préparée à partir d'un

tel échantillon permet ensuite de rechercher très précocement des signes probables de l'évolution d'un cancer même en l'absence d'image à la radiographie.

[0085] L'invention peut être utilisée sous forme de BioPuce. La BioPuce exploite les propriétés de la réaction d'hybridation par laquelle deux brins d'ADN dits complémentaires se lient l'un à l'autre d'une manière très spécifique. L'invention peut être utilisée en recherchant spécifiquement un ou plusieurs marqueurs ADN de la pathologie en utilisant une technique d'amplification de l'ADN à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques de l'ADN à rechercher.

Revendications

1. Procédé de détection *in vitro* de la présence d'une pathologie neurodégénérative ou d'une tumeur solide chez un sujet, comprenant (i) la préparation, à partir d'un échantillon de cellules sanguines du sujet, d'acides nucléiques comprenant des ARN ou des ADNc dérivés de ceux-ci et (ii) l'hybridation des acides nucléiques préparés avec au moins une banque d'acides nucléiques comprenant des acides nucléiques spécifiques de formes d'épissages de gènes caractéristiques d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide, le profil d'hybridation indiquant la présence de cellules sanguines caractéristiques de la pathologie dans l'échantillon.
2. Procédé selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** la banque comprend en outre des acides nucléiques spécifiques de gènes dont le niveau d'expression est modifié dans une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, **caractérisé en ce que** la ou les banques sont déposées sur un support.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisé en ce que** les acides nucléiques préparés à partir de l'échantillon sont des ARN totaux ou messagers, éventuellement amplifiés, ou des ADNc dérivés de ceux-ci.
5. Procédé selon la revendication 4, **caractérisé en ce que** les acides nucléiques sont marqués.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, **caractérisé en ce que** les cellules sanguines sont des cellules nucléées.

7. Procédé selon la revendication 6, **caractérisé en ce que** les cellules sanguines nucléées comprennent des lymphocytes, des macrophages, des monocytes et/ou des cellules dendritiques.

8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, pour la détection *in vitro* de la présence de la sclérose amyotrophique latérale (ALS) chez un sujet.

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, pour la détection *in vitro* de la présence d'une tumeur solide sélectionnée parmi les tumeurs du foie, poumon, tête et cou, mélanome, vessie, sein et prostate chez un sujet.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la détection *in vitro* du stade d'évolution et/ou de la localisation d'une pathologie neurodégénérative,

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la détection *in vitro* du stade d'évolution et/ou de la localisation d'une tumeur solide.

12. Procédé de préparation d'une banque d'acides nucléiques caractéristiques d'un état pathologique, **caractérisé en ce qu'il comprend** (i) l'obtention d'une première préparation d'acides nucléiques à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide, (ii) l'obtention d'une préparation d'acides nucléiques de référence à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme ne présentant pas ladite pathologie, (iii) une étape d'hybridation entre ladite première préparation et la préparation de référence, et (iv) la récupération, à partir des hybrides formés, de clones d'acides nucléiques spécifiques de formes d'épissages de gènes caractéristiques de la cellule sanguine provenant de l'organisme en situation de pathologie.

13. Procédé de préparation d'une banque d'acides nucléiques caractéristiques du stade d'évolution d'une pathologie, **caractérisé en ce qu'il comprend** (i) l'obtention d'une première préparation d'acides nucléiques à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant une pathologie neurodégénérative ou une tumeur solide à un stade d'évolution déterminé, (ii) l'obtention d'une préparation d'acides nucléiques de référence à partir d'une cellule sanguine isolée d'un organisme présentant ladite pathologie à un stade d'évolution différent, (iii) une étape d'hybridation entre ladite première préparation et la préparation de référence, et (iv) la récupération, à partir des hybrides formés, de clones d'acides nucléiques spécifiques de formes d'épissages de gènes caractéristiques de la cellule sanguine

provenant de l'organisme au stade d'évolution déterminé de la pathologie.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, **caractérisé en ce que** la banque est déposée sur un support.

Patentansprüche

10 1. Verfahren zum *in vitro* Nachweis des Vorliegens einer neurodegenerativen Krankheit oder eines festen Tumors bei einer Person, umfassend (i) Herstellung von Nucleinsäuren aus einer Probe an Blutzellen der Person, umfassend RNAs oder davon abstammende cDNAs, und (ii) Hybridisierung der hergestellten Nucleinsäuren mit wenigstens einer Bank an Nucleinsäuren, umfassend Nucleinsäuren, die für Spleißformen von charakteristischen Genen einer Blutzelle spezifisch sind, die aus einem eine neurodegenerative Krankheit oder einen festen Tumor aufweisenden Organismus isoliert ist, wobei das Hybridisierungsmuster auf das Vorliegen von Blutzellen in der Probe hinweist, die für die Krankheit charakteristisch sind.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bank außerdem Nucleinsäuren umfasst, die für Gene spezifisch sind, deren Expressionsniveau in einer Blutzelle verändert ist, die aus einem eine neurodegenerative Krankheit oder einen festen Tumor aufweisenden Organismus isoliert ist.

20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Bank oder die Banken auf einem Träger angeordnet sind.

25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** die aus einer Probe hergestellten Nucleinsäuren Gesamt-RNAs oder mRNAs, möglicherweise amplifiziert, oder davon abstammende cDNAs sind.

30 5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Nucleinsäuren markiert sind.

35 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Blutzellen Zellkerne enthalten.

40 7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zellkerne enthaltenden Blutzellen Lymphocyten, Makrophagen, Monocyten und/oder dendritische Zellen umfassen.

45 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum *in vitro* Nachweis des Vorliegens der

amyotrophen Lateralsklerose (ALS) bei einer Person.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum in vitro Nachweis des Vorliegens eines festen Tumors, ausgewählt aus Tumoren der Leber, Lunge, des Schädelns und Halses, Melanom, der Blase, Brust und Prostata bei einer Person.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum in vitro Nachweis des Entwicklungsstadiums und/oder der Lokalisierung einer neurodegenerativen Krankheit.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zum in vitro Nachweis des Entwicklungsstadiums und/oder der Lokalisierung eines festen Tumors.

12. Verfahren zur Herstellung einer Bank an Nucleinsäuren, die für einen Krankheitszustand charakteristisch sind, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Verfahren umfasst (i) Gewinnung eines ersten Nucleinsäure-Präparates aus einer Blutzelle, die aus einem eine neurodegenerative Krankheit oder einen festen Tumor aufweisenden Organismus isoliert ist, (ii) Gewinnung eines Präparates aus Referenz-Nucleinsäuren aus einer Blutzelle, die aus einer besagten Krankheit nicht aufweisenden Organismus isoliert ist, (iii) einen Hybridisierungsschritt mit besagtem ersten Präparat und dem Referenz-Präparat, und (iv) und die Wiedergewinnung, aus den gebildeten Hybriden, der Nucleinsäure-Klone, die für Spleißformen von charakteristischen Genen der Blutzelle spezifisch sind, die vom Organismus in dem Krankheitszustand stammt.

13. Verfahren zur Herstellung einer Bank an Nucleinsäuren, die für das Entwicklungsstadium einer Krankheit charakteristisch sind, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Verfahren umfasst (i) Gewinnung eines ersten Nucleinsäure-Präparates aus einer Blutzelle, die aus einem eine neurodegenerative Krankheit oder einen festen Tumor in einem bestimmten Entwicklungsstadium aufweisenden Organismus isoliert ist, (ii) Gewinnung eines Präparates aus Referenz-Nucleinsäuren aus einer Blutzelle, die aus einer besagten Krankheit in einem anderen Entwicklungsstadium aufweisenden Organismus isoliert ist, (iii) einen Hybridisierungsschritt mit besagtem ersten Präparat und dem Referenz-Präparat, und (iv) und die Wiedergewinnung, aus den gebildeten Hybriden, der Nucleinsäure-Klone, die für Spleißformen von charakteristischen Genen der Blutzelle spezifisch sind, die vom Organismus in dem bestimmten Entwicklungsstadium der Krankheit stammt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 oder 13,

dadurch gekennzeichnet, dass die Bank auf einem Träger angeordnet ist.

5 **Claims**

1. A process for the in vitro detection of the presence of a neurodegenerative disease or of a solid tumor in a subject, comprising (i) preparing, from a sample of blood cells from the subject, nucleic acids comprising RNAs or cDNAs derived therefrom and (ii) hybridizing the nucleic acids so prepared with at least one nucleic acid library comprising nucleic acids specific for splicing forms of genes characteristic of a blood cell isolated from an organism presenting a neurodegenerative disease or a solid tumor, the hybridization profile indicating the presence of blood cells characteristic of the pathology in the sample.

10 2. Process according to claim 1, wherein the library further comprises nucleic acids specific for genes whose level of expression is modified in a blood cell isolated from an organism presenting a neurodegenerative disease or a solid tumor.

15 3. Process according to any one of claims 1 or 2, wherein the library(ies) is(are) deposited on a support.

20 4. Process according to any one of claims 1 to 3, wherein the nucleic acids prepared from the sample are total or messenger RNAs, optionally amplified, or cDNAs derived therefrom.

25 5. Process according to claim 4, wherein the nucleic acids are labelled.

30 6. Process according to any one of the preceding claims, wherein the blood cells are nucleated cells.

35 7. Process according to claim 6, wherein the nucleated blood cells comprise lymphocytes, macrophages, monocytes and/or dendritic cells.

40 8. Process according to any one of the preceding claims, for the in vitro detection of the presence of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) in a subject.

45 9. Process according to any one of the preceding claims, for the in vitro detection of the presence of a solid tumor selected from liver, lung, head-and-neck, melanoma, bladder, breast and prostate tumors in a subject.

50 10. Process according to any one of the preceding claims, for the in vitro detection of the stage of progression and/or the site of a neurodegenerative dis-

ease.

11. Process according to any one of claims 1 to 9, for
the in vitro detection of the stage of progression
and/or the site of a solid tumor. 5

12. A process of preparation of a nucleic acid library
characteristic of a pathological condition, wherein
said process comprises (i) obtaining a first nucleic
acid preparation from a blood cell isolated from an
organism presenting a neurodegenerative disease
or a solid tumor, (ii) obtaining a reference nucleic
acid preparation from a blood cell isolated from an
organism not presenting said pathology, (iii) a hy-
bridization step between said first preparation and
said reference preparation, and (iv) recovering,
from the hybrids formed, nucleic acid clones specif-
ic for splicing forms of genes characteristic of the
blood cell from the organism in pathological condi-
tion. 10 15 20

13. A process of preparation of a nucleic acid library
characteristic of the stage of progression of a pa-
thology, wherein said process comprises (i) obtain-
ing a first nucleic acid preparation from a blood cell
isolated from an organism presenting a neurode-
generative disease or a solid tumor at a defined
stage of progression, (ii) obtaining a reference nu-
cleic acid preparation from a blood cell isolated from
an organism presenting said pathology at a different
stage of progression, (iii) a hybridization step be-
tween said first preparation and said reference
preparation, and (iv) recovering, from the hybrids
formed, nucleic acid clones specific for splicing
forms of genes characteristic of the blood cell from
the organism at the defined stage of progression of
the pathology. 25 30 35

14. Process according to any one of claims 12 or 13,
wherein the library is deposited on a support. 40

45

50

55

Job : 204
Date: 4/11/2007
Time: 10:38:13 AM



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 689 051 B1

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

(45) Date of publication and mention
of the grant of the patent:
20.11.2002 Bulletin 2002/47

(51) Int Cl.7: **G01N 33/487, G01N 33/483,**
A61B 5/04, G01N 27/00,
C12M 1/34, G01N 27/403

(21) Application number: 95108977.0

(22) Date of filing: 09.06.1995

(54) Cell potential measurement apparatus having a plurality of microelectrodes

Zellpotentialmessvorrichtung mit mehreren Mikroelektroden

Appareil de mesure du potentiel cellulaire avec plusieurs microélectrodes

(84) Designated Contracting States:
DE FR GB IT

(30) Priority: 13.06.1994 JP 13017694

(43) Date of publication of application:
27.12.1995 Bulletin 1995/52

(73) Proprietor: Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.
Kadoma-shi, Osaka 571 (JP)

(72) Inventors:

- Sugihara, Hirokazu,
Matsushita Elec. Ind. Co., Ltd
Osaka 576 (JP)
- Kamei, Akihito, Matsushita Elec. Ind. Co., Ltd.
Nara-shi, Nara 631 (JP)
- Kobayashi, Yasushi,
Matsushita Elec. Ind. Co., Ltd.
Hirakata-shi, Osaka 573-01 (JP)
- Taketani, Makoto, Matsushita Elec. Ind. Co., Ltd.
Tsuzuki-gun, Kyoto 610-03 (JP)
- Mitsumata, Tadayasu,
Matsushita Elec. Ind. Co., Ltd.
Hirakata-shi, Osaka 573 (JP)

(74) Representative: **VOSSIUS & PARTNER**
Siebertstrasse 4
81675 München (DE)

(56) References cited:
EP-A- 0 585 933 **US-A- 5 187 096**

- BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 9, no. 1994, 1994, AMSTERDAM, NL, pages 737-741, XP002037334 W. NISCH ET AL.: "A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro"
- JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, vol. 5, 1982, AMSTERDAM, NL, pages 13-22, XP002037335 G.W. GROSS, ET AL.: "Recording of spontaneous activity with photoetched microelectrode surfaces from mouse spinal neurons in culture"
- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 16, no. 75 (P-1316), 24 February 1992 & JP 03 265814 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD), 26 November 1991,

EP 0 689 051 B1

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

Description

[0001] This invention relates to a cell potential measurement apparatus which is used in the field of electro-neurophysiology for measuring the potential change associated with activities of nerve cells or nerve organs.

[0002] Recently, medical investigations into nerve cells and the possibility of using nerve cells as electric elements have been actively pursued. When nerve cells are active, an action potential is generated. This action potential arises from a change in ion concentration inside and outside the cell membrane which is accompanied by a change in ion permeability in nerve cells and thus from the change in cell membrane potential accompanied thereby. Therefore, measuring this potential change accompanied by the ion concentration change (that is, the ion current) near the nerve cells with electrodes enables the detection of activities of nerve cells or nerve organs.

[0003] In order to measure the above-mentioned potential arising from cell activities, it is possible, for example, to insert an electrode comprising glass into an area of cells to measure the extracellular potential. When the evoked potential due to stimulation is measured, a metal electrode for stimulation is inserted together with a glass electrode for recording. However, measurement by the insertion of these electrodes has the possibility of damaging the cells, and measurement over a long period of time is difficult to carry out. In addition, due to restrictions of space and the need for operating accuracy, multi-point simultaneous measurements are also difficult to carry out.

[0004] Therefore, the present inventors developed a planar electrode comprising an insulation substrate and a multiplicity of microelectrodes, their conductive patterns being formed thereon with the use of a conductive material, and a cell culture could be placed on that surface (disclosed in Laid-open Japanese patent application Nos. (Tokkai Hei) 6-78889 and 6-296595). With this planar electrode, multi-point simultaneous measurements of potential change can be carried out without being affected by restrictions of space at a plurality of points with a short electrode-to-electrode distance. Also, this electrode enables long-term measurement.

[0005] An apparatus for cell potential measurement is described in BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, vol. 9, no. 1994, 1994, AMSTERDAM NL, pages 737-741, W. NISCH ET AL.: 'A thin film microelectrode array for monitoring extracellular neuronal activity in vitro'. This apparatus uses a microelectrode array being provided on a glass substrate. By using this apparatus neuronal electrical activity can be recorded and analyzed.

[0006] In EP-0 585 933 A2 a planar electrode has been described. This planar electrode enables multi-point simultaneous stimulation and measurement of nerve cells as well as signal transmission and observation throughout many cells.

[0007] However, a measurement apparatus which

can efficiently use this kind of planar electrode, conduct measurements accurately and efficiently, and improve the measurement results has been strongly desired. Therefore, it is an object of this invention to provide a cell potential measurement apparatus which is capable of accomplishing these needs in the art.

[0008] In order to accomplish these and other objects and advantages, a cell potential measurement apparatus of this invention comprises the features of claim 1.

[0009] It is preferable that the cell potential measurement apparatus of this invention further comprises an optical observation means for observing the cells optically. It is also preferable that the cell potential measurement apparatus of this invention further comprises a cell culturing means for maintaining an environment for culturing cells which are placed on the integrated cell holding instrument. This configuration enables measurement over a long period of time.

[0010] Generally, the measurement conducted by means of the above-configured apparatus of this invention is carried out, for example, in the following steps. Sample cells are placed in a cell holding part of an integrated cell holding instrument, and a plurality of microelectrodes contact the cells.

[0011] An image of the cells is obtained by an optical observation means. A stimulation signal is applied between a pair of electrodes selected optionally from the plurality of microelectrodes by a stimulation signal supply means via an electric connection means. A change of the evoked potential over time which is obtained in each of the other electrodes is provided to a signal processing means via the electric connection means, which is then output, for example, to a display device etc. after going through the necessary signal processing. The measurement of the spontaneous potential which is not provided with a stimulation signal is carried out in a similar way.

[0012] The above-mentioned electro-chemical measurement of cells must be conducted in a condition in which the cells are alive. Therefore, it is common to use cultured cells, and the cell holding part of the integrated cell holding instrument can be equipped with a culture medium. Since the integrated cell holding instrument is detachable from the measurement apparatus, each integrated cell holding instrument can be placed inside an ordinary incubator for cell cultures and then taken out from the incubator and placed in the measurement apparatus. When a cell culturing means is further provided to maintain an environment for culturing the cells on the integrated cell holding instrument, long-term measurement is enabled. This cell culturing means comprises a temperature adjustment means for maintaining a constant temperature, a means for circulating a culture solution, and a means for supplying a mixed gas of air and carbon dioxide (e.g., CO₂ 5%).

[0013] It is preferable that the integrated cell holding instrument comprises a plurality of microelectrodes arranged in a matrix form (latticed) on the surface of a

glass plate, conductive patterns for drawing these microelectrodes, electric contact points which are connected to edge parts of these conductive patterns, and a coating of insulation covering the surface of these conductive patterns, and the cell holding part is disposed in an area including the plurality of microelectrodes.

[0014] The use of a transparent glass plate as the substrate facilitates optical observations of the cells. Therefore, it is preferable that the conductive patterns or the insulation coating are also substantially transparent or translucent. Furthermore, when the plurality of microelectrodes is arranged in a matrix form, it is easier to specify positions of electrodes which are applied with stimulation signals or electrodes where voltage signals arising from cell activities are detected. For example, it is preferable to arrange 64 microelectrodes in 8 columns and 8 rows. In addition, the surface area of each electrode should be as great as possible for reducing surface resistance and enhancing detection sensitivity. However, taking restrictions etc. arising from the electrode-to-electrode distance and space resolution of measurement into consideration, it is preferable that each electrode has a surface area of from $4 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ to $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$.

[0015] According to the configuration of the invention, fixation of the glass plate and routing the microelectrodes to the outside can be performed easily and accurately. Furthermore, it is preferable that the electric connection means not only fixes the holder, but also comprises a printed circuit board having an outside connection pattern which is connected to the contact of the holder via a connector. As a result, connection with outside instruments, namely, with a stimulation signal supply means and a signal processing means is facilitated. For the transmission of stimulation signals or detection signals with as little attenuation and distortion as possible, the contact resistance of the electric contact point with the contact as well as the contact resistance of the contact with the connector are both preferably below 30 m ohm.

[0016] In addition, it is preferable that the optical observation means comprises an optical microscope, and an image pick-up device and an image display device connected to the optical microscope. In other words, the image of the cells which is enlarged by a microscope is picked up by an image pick-up device (e.g., video camera) and then displayed in an image display device (e.g., a high-accuracy display), so that it is easier to conduct the measurement while observing the cells and the electrode position. More preferably, when the optical observation means is further comprised of an image storage device, it is possible to record measurement results.

[0017] Also, when a pulse signal generator is used as the stimulation signal supply means, various kinds of signal waveforms can be applied as stimulation signals to the cells. It is preferable that the signal processing means comprises a multi-channel amplifier which amplifies a detection signal arising from cell activities and

5 a multi-channel display device which displays an amplified signal waveform in real-time, and that signal waveforms (change of cell potential over time) obtained from a plurality of electrodes can be displayed simultaneously.

[0018] It is preferable that a computer is provided to output the stimulation signal via a D/A converter, and at the same time, to receive and process an output signal arising from electric physiological activities of the cells 10 via an A/D converter. As a result, the stimulation signal can be determined as an optional waveform on the screen or a waveform of a detection signal can be displayed on the screen. In addition to these operations, it is easier to display these signals after being processed 15 in various forms or to output them to a plotter or to store them. Furthermore, with the use of this computer, the optical observation means and the cell culturing means can be controlled.

[0019] FIG. 1 is a perspective view showing an integrated cell holding instrument used for a cell potential measurement apparatus in one embodiment of this invention.

[0020] FIG. 2 is an assembly diagram of an integrated cell holding instrument.

[0021] FIG. 3 is a top view showing 64 microelectrodes and conductive patterns disposed in the center of a planar electrode comprising an integrated cell holding instrument.

[0022] FIG. 4 is a model cross-sectional view of a planar electrode.

[0023] FIGS. 5 (A) and 5 (B) are a top view and a side cross-sectional view showing a state in which a planar electrode is fixed by being held between upper and lower holders.

[0024] FIG. 6 is a perspective view of the planar electrode and the upper and lower holders of FIGS. 5 (A) and 5 (B).

[0025] FIG. 7 is a side view of a contact attached to an upper holder.

[0026] FIG. 8 is an assembly diagram of an integrated cell holding instrument seen from an opposite direction of FIG. 2.

[0027] FIG. 9 is a block diagram of a cell potential measurement apparatus in one embodiment of this invention.

[0028] FIGS. 10 (A) and 10 (B) are graphs showing one comparative example of a voltage waveform arising from activities of cultured cells measured by means of an integrated cell holding instrument used in this invention and a voltage waveform measured by means of a conventional general purpose glass electrode (electrode for measurement of extracellular potential).

[0029] FIGS. 11 (A) to 11 (C) are diagrams showing measurement results of the spontaneous potential of cultured cells measured by using an apparatus of this invention.

[0030] FIGS. 12 (A) to 12 (C) are diagrams showing measurement results of the evoked potential of cultured

cells measured by using an apparatus of this invention.

[0031] This invention will now be described in detail by referring to the attached figures and the following examples,. The examples are illustrative and should not be construed as limiting the invention in any way.

[0032] First, an integrated cell holding instrument used for a cell potential measurement apparatus of this invention will be explained. The integrated cell holding instrument 1, as shown as a perspective view in FIG. 1 and as an assembly diagram in FIG. 2, comprises a planar electrode 2, which is disposed with a plurality of microelectrodes and their conductive patterns on the surface of a glass plate, half-split holders 3, 4 for fixing the planar electrode 2 by holding it from the top and bottom, and a printed circuit board 5 on which these holders are fixed.

[0033] The planar electrode 2 is approximately the same as that disclosed in Laid-open Japanese patent application No. (Tokkai Hei) 6-78889 and others. The planar electrode 2 comprises, for example, a substrate made of a transparent plexiglass having a thickness of 1.1 mm and a size of 50 x 50 mm, and in the center of this substrate, 64 microelectrodes 11 are formed in a matrix form of 8 x 8, and each microelectrode is connected to a conductive pattern 12 (cf. FIG. 3). Each of the electrodes 11 has a size of 50 x 50 μm square (area $25 \times 10^2 \mu\text{m}^2$), and the center-to-center distance between adjacent electrodes is 150 μm . Furthermore, each side of the substrate has 16 electric contact points 7 totalling to 64 points (cf. FIG. 2). These electric contact points 7 are connected with the 64 microelectrodes 11 disposed in the center of the substrate to correspond 1 to 1 to the conductive patterns 12. The 16 electric contact points 7 on each side are arranged with a pitch of 1.27 mm. Next, a method of manufacturing this planar electrode 2 will be explained based on its cross-sectional view shown as FIG. 4. Each part in FIG. 4 is shown in an enlarged scale for convenience.

[0034] ITO (indium tin oxide), for example, is applied to form a layer of 150 nm thickness on the surface of a glass plate 13, which is then formed into the conductive patterns 12 using a photoresist and etching. On top of this layer, a negative photosensitive polyimide is applied to form a layer of 1.4 μm thickness, which is then formed into an insulation film 14 in a similar manner. The ITO layer is exposed at the microelectrodes, and at the electric contact points, and nickel 15 of 500 nm thickness and gold 16 of 50 nm thickness, are coated on these parts. A cylindrical polystyrene frame 6 (cf. FIG. 2) with an inner diameter of 22 mm, an outer diameter of 26 mm, and a height of 8 mm is adhered (via a conductive pattern 8 and an insulation film 9) on the glass plate 13 using a silicone adhesive. This cylindrical polystyrene frame 6 is fixed with its center matching the center of the glass plate 13, that is, the central part of the 64 microelectrodes, and the inside of the polystyrene frame 6 becomes a cell holding part. The inside of this polystyrene frame 6 is filled with a solution comprising 1 wt.

% of chloroplatinic acid, 0.01 wt.% of lead acetate, and 0.0025 wt.% of hydrochloric acid. An electric current of 20 mA/cm² is generated for 1 minute to deposit platinum black 11a on the surface of the gold plating of the microelectrodes.

[0035] Next, the half-split holders 3, 4 for fixing the planar electrode 2 by holding from the top and bottom will be explained. The holders 3, 4 made, for example, of resin are provided with a stage part for holding a frame part of the planar electrode 2 and with a rectangular opening in the central part, as shown in FIG. 2. The upper holder 3 is equipped with a pair of fixtures 8 and 16 x 4 pairs of contacts 9.

[0036] A top view of the holders 3, 4 which hold and fix the planar electrode 2 is shown in FIG. 5 (A), and its side view (B-B cross-sectional view) is shown in FIG. 5 (B), and its perspective view seen from a bottom side is shown in FIG. 6. As clearly shown in these figures, the fixture 8 is pivoted on two opposing sides of the upper holder 3 by an axis pin 8a. Furthermore, a groove 4a is formed on two opposing sides of the lower holder 4 in the bottom face. By fitting a convex part 8b of the fixture 8 into the groove 4a, the upper and the lower holders 3, 4 are firmly fixed with the planar electrode 2 held in between.

[0037] The 64 contacts 9, which are disposed in the upper holder 3 to correspond to the electric contact points 7 of the planar electrode 2, are formed by processing an elastic, conducting metal plate such as a plate comprising BeCu coated with Ni and Au, and the contact 9 has a shape shown in FIG. 7. In other words, the contact 9 is comprised of a pin part 9a, and its base part 9b, and a movable contact part 9d extending from the base part 9b via a curved part 9c. According to this structure, the movable contact part 9d is capable of elastic displacement against the base part 9b. The upper holder 3 has 64 (16 x 4) holes which are inserted with the pin parts 9a of the contacts 9, and the same number of grooves are also formed which fit the base parts 9b.

[0038] As shown in FIG. 2 and FIG. 5 (B), the pin part 9a protrudes from the upper holder 3 at the point where the contact 9 is inserted into the above-mentioned hole and the groove and fixed. By alternately arranging the contacts 9 having two different lengths of the base part 9b, 16 pin parts 9a protruding from the upper holder 3 are lined in two staggered rows. This pin part 9a is connected to a connector which is mounted on a printed circuit board 5 used for connection with the outside.

[0039] On the other hand, the movable contact part 9d of the contact 9 protrudes from the bottom face of the upper holder 3 at the point where the contact 9 is inserted into the holder and the groove of the upper holder 3 and fixed. This arrangement is shown in FIG. 8, which is an assembly diagram seen from the side opposite the assembly diagram of FIG. 2. In this state, the planar electrode 2 is fixed between the holders 3, 4, the movable contact part 9d of each contact 9 touches the electric contact point 7 of the planar electrode 2, and a pre-

determined contact pressure is exerted on the contact part due to elastic deformation of the curved part 9c. In this way, the electric contact point 7, which is connected to the microelectrode 11 of the planar electrode 2 by way of the conductive pattern 12, is electrically connected with small contact resistance (less than 30 m ohm) to the contact 9.

[0040] Next, the printed circuit board 5 will be explained. This printed circuit board 5 serves not only for fixing the assembly of the planar electrode 2 and the holders 3, 4, but also for routing an electrical connection via a connector to the outside, starting from the microelectrode 11 of the planar electrode 2 via the conductive pattern 12 via the electric contact point 7 to the contact 9. Furthermore, this printed circuit board 5 facilitates handling procedures, for example, installation to the measurement apparatus.

[0041] This printed circuit board 5 comprises a glass epoxy substrate disposed with double-faced patterns, and on the back face shown in FIG. 8, a connector 5a is disposed at four parts surrounding a circular opening formed in the center. By inserting the 16 pin parts 9a which are protruding in two staggered rows from the four surface parts of the upper holder 3 into each corresponding connector 5a, the assembly of the planar electrode 2 and the holders 3, 4 is fixed at the printed circuit board 5, and at the same time, they are connected electrically.

[0042] At an edge part 5b on both sides of the printed circuit board 5, electric contact points are formed at 2.54 mm pitch used for a double-faced connector edge, and these electric contact points and the connectors 5a in the central part are connected by conductive patterns 5c. An inner row of the double-sided connector 5a is formed by a surface pattern, whereas an outer row is formed by a back side pattern, and each of the edge parts 5b is provided with 32 electric contact points formed for both sides together, totalling 64 electric contact points. For the purpose of assuring mechanical fixation, the upper holder 3 can be fixed to the printed circuit board 5 using a vise.

[0043] A preferable configuration of a cell potential measurement apparatus using the above-configured integrated cell holding instrument 1 is shown in FIG. 9. The measurement apparatus of this embodiment comprises the above-mentioned integrated cell holding instrument 1, an optical observation means 20 including an inverted microscope 21 for optical observations of cells which are placed in this integrated cell holding instrument 1, a computer 30 including a means of providing a stimulation signal to the cells and a means of processing an output signal from the cells, and a cell culturing means 40 for maintaining a suitable culture medium for the cells.

[0044] Besides the inverted microscope 21 (for example, "IMT-2-F" or "IX70" manufactured by OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) where the integrated cell holding instrument 1 is installed, the optical observation means

20 also includes a SIT camera 22 used for a microscope (for example, "C2400-08" manufactured by HAMAMATSU PHOTONICS K.K.), a high-accurate display 23, and an image filing device 24 (for example, "TQ-2600" or "FTQ-3100" manufactured by MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.). A SIT camera is a general term used for cameras which apply a static induction transistor to an image pickup tube, a SIT camera being a representative example of sensitive cameras.

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100

However, the high-accuracy display 23 can be used also as a display for the computer 30. The specific devices described above in parenthesis are illustrative examples, and the invention is not limited to these devices only. This is also true for the examples shown in the following.

[0045] As for the computer 30, a personal computer (for example, compatible with WINDOWS) is used which is mounted with an A/D conversion board and software for measurement. The A/D conversion board 20 includes an A/D converter 31 and a D/A converter 32 shown in FIG. 9. The A/D converter 31 has 16 bits and 64 channels, and the D/A converter 32 has 16 bits and 8 channels.

[0046] The measuring software includes software for 25 determining conditions needed for providing a stimulation signal or recording conditions of an obtained detection signal. With the use of this type of software, the computer 30 is not only capable of structuring the means of providing a stimulation signal to the cells and the means 30 of processing the detection signal from the cells, but also is capable of controlling the optical observation means (the SIT camera and the image filing device) or the cell culturing means.

[0047] In the following, particularly useful specifications for the software for measurement will be explained. On a computer screen directed to parameter setting, it is possible to determine complicated stimulation conditions by drawing a stimulation waveform on the screen using a keyboard or a mouse. Furthermore, recording 40 conditions are determined such that 64 input channels, a sampling rate of 10 kHz, and continuous recording over several hours are enabled. In addition, the electrode which provides a stimulation signal or the electrode which draws out a detection signal from the cells 45 can be specified by pointing to a microscope image displayed on the screen with a mouse or a pen. Besides, various conditions such as temperature or pH of the cell culturing means 40 can be determined by using the keyboard.

[0048] A recording screen displays a spontaneous action potential or an evoked potential detected from the cells in real-time at a maximum of 64 channels. Furthermore, the recorded spontaneous action potential or the evoked potential can be displayed on top of a microscope image of cells. When the evoked potential is measured, the whole recording waveform is displayed. When the spontaneous action potential is measured, the recording waveform is displayed only when an oc-

cence of spontaneous action is detected by a spike detection function using a window discriminator or a waveform discriminator. When the recording waveform is displayed, measurement parameters (e.g., stimulation conditions, recording conditions, temperature, pH) at the time of recording are simultaneously displayed in real-time. There is also an alarm function provided in case when a temperature or pH goes beyond permissive limits.

[0049] On a computer screen for data analysis, FFT analysis, coherence analysis, and correlation analysis can be conducted. In addition, this screen has other functions, such as a single spike separation function using a waveform discriminator, a temporal profile display function, a topography display function, an electric current source density analysis function. Results of these analyses can be displayed on top of the microscope image stored in the image filing device.

[0050] When a stimulation signal is output from the above-configured computer 30, this stimulation signal is forwarded by way of the D/A converter 32 and an isolator 33 (for example, "BSI-2" manufactured by BAK ELECTRONICS CO., LTD.) to the cells. In other words, the stimulation signal is applied between two points selected from the 64 microelectrodes 11 in the integrated cell holding instrument 1. Then, an evoked potential arising between each of the microelectrodes 11 and a GND level (potential of culture solution) is input to the computer 30 via 64 channels of a sensitive amplifier 34 (for example, "AB-610J" manufactured by NIHON KODEN CO., LTD.) and the A/D converter 31. The amplification factor of the amplifier 34 is 100 dB, and the frequency band is from 0 to 10 kHz. However, when an evoked potential by a stimulation signal is measured, the frequency band is determined to be from 100 Hz to 10 kHz using a low cut filter.

[0051] Next, the cell culturing means 40 is provided with a temperature adjuster 41, a circulation means 42 of culture solution and a means 43 for supplying a mixed gas of air and carbon dioxide. Actually, the cell culturing means 40 can be comprised of a product equivalent to a microincubator such as "PDMI-2" and a product equivalent to a temperature controller such as "TC-202" (both products manufactured by MEDICAL SYSTEMS CO., LTD.), and a CO₂ bomb, for example, is used. This microincubator can control the temperature in the range of 0 to 50°C by a Peltier element, and this microincubator is capable of handing a liquid delivery speed of below 3.0 ml/min and an air supply speed of below 1.0 l/min. Alternatively, a microincubator integrated with a temperature controller (for example, "IMT2-IBSV" manufactured by OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.) may be used.

[0052] A preferable embodiment of the cell potential measurement apparatus of this invention was explained above. However, the cell potential measurement apparatus of this invention is not limited to this embodiment only and can be implemented for example, in various other forms described in the following.

[0053] Although a means for providing a stimulation signal to cells is comprised of a computer and a D/A converter in the above-mentioned embodiment, this means may be comprised of a general purpose or a special purpose pulse signal generator. Here, the stimulation signal is preferably determined as a bipolar constant voltage pulse comprising a pair of positive and negative pulses for eliminating artifacts, that is, for preventing DC components from flowing. In addition, it is preferable to convert it to a constant electric current pulse for preventing the electric current from flowing excessively. For example, the stimulation signal is preferably comprised of a positive pulse with a pulse width of 100 μ sec, an interval of 100 μ sec, and a negative pulse of 100 μ sec, and it is preferable that the peak electric current of the positive-negative pulse is in the range of 30 to 200 μ A.

[0054] Furthermore, the installation of the cell culturing means 40 in the measurement apparatus enables continuous measurement over a long period of time. Alternatively, it is also possible to configure the apparatus such that sample cells are placed in an integrated cell holding instrument and cultured inside an incubator which is provided separately from the measurement apparatus, and such that the integrated cell holding instrument is taken out only for a comparatively short-term measurement from the incubator to be installed in the measuring apparatus. In this case, the cell culturing means 40 is not necessarily provided in the measurement apparatus.

[0055] By using the above-mentioned cell potential measurement apparatus, nerve cells or organs were actually cultured on the integrated cell holding instrument and the potential change accompanied by activities of the nerve cells or nerve organs was measured. An example of this measurement will be explained hereafter. Cerebral cortex sections of rats were used as the nerve organs, which were cultured according to a method which will be described later on in an embodiment.

[0056] It will be first referred to results of comparing a voltage waveform measured by means of an integrated cell holding instrument of this invention and a voltage waveform measured by means of a conventional general purpose glass electrode (electrode used for measurement of extracellular potential). Nerve organs which were cultured for 14 days were used as the sample. A stimulation signal was applied between two adjacent electrodes of a planar electrode comprising the integrated cell holding instrument, and a waveform of evoked potential change over time which was induced at 8 electrodes close to the two electrodes was measured. For the purpose of comparison, glass electrodes were sequentially transferred to the vicinity of the above-mentioned eight electrodes by using a three-dimensional micromanipulator, and the same voltage waveform was measured.

[0057] As a result of comparing the voltage waveform measured by using a planar electrode (integrated cell holding instrument) and the waveform measured by us-

ing the glass electrode at eight parts, it was clear that both waveforms were very similar at all the parts. Representative examples of these waveforms are shown in FIG. 10 (A) and FIG. 10 (B). FIG. 10 (A) shows a waveform measured by a planar electrode, and FIG. 10 (B) shows a waveform measured by a glass electrode. When both waveforms are compared, it is clear that there is a slight difference in frequency characteristics. Compared with the measurement using a planar electrode, the measurement using a glass electrode shows a small damage sustained to the follow-up property upon a rapid potential change. This is considered to result from a capacitance difference between a glass electrode and a planar electrode.

[0058] Next, an experiment was conducted to examine the relationship between progressive days of nerve organs cultured on an integrated cell holding instrument and the potential distribution arising from cell activities. Prior to culturing the cells, the surface of a planar electrode was covered with collagen gel for the purpose of enhancing the adhesive property of each electrode in the planar electrode to the cells. In other words, collagen gel with a thickness of less than 50 μ m was formed on the surface of each electrode coated with platinum black and also on the surface of an insulation coating in the vicinity thereof as mentioned above. Then, on top of the collagen gel, and also where a microelectrode was present, a section of cerebral cortex of rats (thickness of less than 500 μ m) was placed and cultured. Measurement results of the spontaneous potential are shown in FIGS. 11 (A) to 11 (C), and measurement results of the evoked potential at the time when a stimulation signal is provided are shown in FIG. 12.

[0059] FIG. 11 (A) shows a microscopic image of the sample cells and the microelectrodes, and waveforms of the spontaneous potential measured at seven electrode parts indicated as 1 to 7 on this image are shown in FIG. 11 (B) and FIG. 11 (C). FIG. 11 (B) is a waveform measured on the sixth day after culture, and FIG. 11 (C) is a waveform measured on the tenth day after culture. The scale of the microscopic image, time of the measurement waveforms, and the scale of the voltage are indicated in the figure. According to the measurement results, it is confirmed, for example, that on the sixth day after culture, the spontaneous activities of the cells measured at each electrode are weak, and synchronic properties of the electrodes to each other can be hardly observed, whereas on the tenth day after culture, a large number of nerve cells become active simultaneously, indicating that the synchronic properties of the electrodes to each other increased.

[0060] FIG. 12 (A) also shows a microscopic view of the sample cells and the microelectrodes. Image processing, which is included in the software for measurement in the above-mentioned computer, was applied to draw an outline of the cells and positions of each electrode from the microscopic image onto the screen. Furthermore, the voltage waveform measured at each elec-

trode was displayed thereon, as shown in FIG. 12 (B) and FIG. 12 (C). FIG. 12 (B) shows a distribution of the evoked potential on the fifth day after culture, and FIG. 12 (C) shows the same on the tenth day after culture. A

5 pair of electrodes indicated on the upper right side with a + and - sign are electrodes applied with a stimulation signal. Right above a small square sign showing the position of each electrode, a waveform measured by this electrode is displayed. In these waveforms, a part where

10 a large vertical swing is observed on the left end is an artifact corresponding directly to the stimulation signal, and the potential change after the artifact indicates actual cell activities. As a result of these measurements, it is confirmed, for example, that on the fifth day after

15 culture, the cell activities are limited to a place which is comparatively close to the electrode positions applied with the stimulation signal, but on the tenth day after culture, the cell activities can be observed in a wide range and their scale (amplitude) becomes larger.

20 [0061] Next, examples of a suitable culture method for cerebral cortex slices will be explained.

1) Culture medium

25 [0062] The following additives were added to a culture medium in which Dulbecco modified Eagle's medium and HamF-12 medium were mixed in a volume ratio of 1:1 (media manufactured by GIBCO CO., LTD. 430-2500EB).

30 * glucose, GIBCO CO., LTD. 820-5023IN, 2.85 mg/L (totalling to 6 mg/L together with glucose contained originally in the above-mentioned culture medium)
 * putrescine, SIGMA CO., LTD. P5780, 100 μ M
 35 * progesterone, SIGMA CO., LTD. P8783, 20 nM
 * hydrocortisone, SIGMA CO., LTD. H0888, 20 nM
 * sodium selenite, WAKO CO., LTD. 198-0319, 20 nM
 * insulin, SIGMA CO.; LTD. I6634, 5 mg/L
 * transferrin, SIGMA CO., LTD. T147, 100 mg/L
 40 * sodium bicarbonate, SIGMA CO., LTD. 2.438 g/L
 * addition of a suitable amount of IN HCl or IN NaOH to adjust to pH 7.4

45 [0063] After the above-mentioned additives were added, filtration and sterilization were conducted, and the culture medium was preserved at 4°C and ready to be used. This culture medium is hereinafter simply called "culture medium".

50 2) Structure of a well on a planar electrode

[0064] For the convenience of culturing nerve cells or nerve organs on a planar electrode, a polystyrene cylinder having an inner diameter of 22 mm, an outer diameter of 26 mm, and a height of 8 mm was adhered in the following steps.

55 (a) On the bottom face of a polystyrene cylinder (in-

ner diameter 22 mm, outer diameter 26 mm, height 8 mm), a sufficient amount of a liquid silicon adhesive (DOW CORNING CO., LTD. 891 or SHIN-ETSU CHEMICAL CO., LTD. KE-42RTV) was applied. (b) The center of a glass substrate in the planar electrode and the center of the polystyrene cylinder were carefully matched and then adhered in this state. (c) By leaving it in an environment in which dust hardly enters for 24 hours, the adhesive was solidified. (d) After dipping in 70 % ethanol for 5 minutes, sterilization was conducted by air-drying inside a clean bench, after which the structure is then ready for processing the electrode surface.

3) Processing of the electrode surface

[0065] In order to enhance cell adhesive property on the surface of a planar electrode, collagen gel was formed on the surface of the electrode by the following method. All of these operations were conducted in a sterilized atmosphere.

(a) Solutions A, B, and C were prepared and iced.

A. 0.3 vol.% diluted hydrochloric acid collagen solution (pH 3.0, NITTA GELATIN CO., LTD. Cellmatrix Type I-A)
 B. Solution comprising a mixture medium of Dulbecco modified Eagle's medium and HamF-12 medium mixed in a volume ratio of 1:1 (GIBCO CO., LTD. 430-2500EB), which is not provided with sodium bicarbonate and is made with a concentration 10 times higher than for an ordinary use, and then filtration and sterilization were conducted thereto.
 C. 2.2 g of sodium bicarbonate and 4.77 g of HEPES (manufactured by GIBCO CO., LTD. 845-1344 IM) were dissolved in 100 mL of 0.05 N sodium hydroxide solution, and filtration and sterilization were conducted thereto.

(b) While cooling, the solutions A, B, and C were mixed at a volume ratio of 8:1:1. At this time, A and B were first mixed thoroughly and C was added afterwards to be mixed.

(c) In a well of a planar electrode which was cooled in advance to about 4°C, 1 mL of the mixed solution of (b) was injected little by little. After the entire electrode surface was covered, the mixed solution was removed as much as possible with a glass Pasteur pipette. Through this operation, a coating of the mixed solution was formed on the electrode surface with a thickness of less than 50μm.

(d) By heating the planar electrode covered with the mixed solution coating at 37°C for 30 minutes, gelatinization of the mixed solution took place, and a

collagen gel matrix was formed.

(e) 1 mL of sterilized water was added into the well of the planar electrode, and about 5 minutes thereafter, the water was removed, thereby washing. (f) The operation of Step (e) was repeated two more times (a total of 3 times).

(g) 1 mL of the culture medium (excluding insulin and transferrin) was injected little by little into the well of the planar electrode, and preserved inside a CO₂ incubator under the conditions of temperature 37°C, relative humidity 97% and higher, CO₂ concentration 5%, and air concentration 95%, which was then ready for use.

15 4) Culture of nerve cells or nerve organs

[0066] Generally speaking, culture forms can be divided into two types. That is, a dissociated cell culture of nerve cells and an organotypic slice culture of a nerve organ. Each form will be explained in the following.

4-1) Dissociated culture of cerebral visual cortex nerve cells of rats

20 25 **[0067]** The following operations were all performed in a sterilized atmosphere.

(a) Brains of fetuses of SD rats at 16-18 days of pregnancy were removed and immersed in iced Hanks' Balanced Salt Solution (manufactured by GIBCO CO., LTD. 450-1250EB).

(b) From the brains in the iced Hanks' Balanced Salt Solution, visual cortices were cut out and transferred to minimum essential medium liquid (manufactured by GIBCO CO., LTD. 410-1100EB).

(c) In the minimum essential medium liquid, the visual cortices were cut into as small pieces as possible, 0.2 mm square at maximum.

(d) The visual cortices cut into small pieces were placed in test tubes for centrifugal separation, and after washing with Hanks' Balanced Salt Solution free from calcium and magnesium three times, they were dispersed in a suitable volume of the same liquid.

(e) In the test tubes for centrifugal separation of Step (d), Hanks' Balanced Salt Solution free from calcium and magnesium with trypsin dissolved at 0.25 % was added to double the total volume. With gentle stirring, enzymatic processes were allowed to take place while the solution was constantly kept at 37 °C for 15 minutes.

(f) To the culture medium shown in 1) (containing additives, hereinafter abbreviated as a culture medium), 10 vol.% of fetal calf serum was added, which is then placed in the test tubes for centrifugal separation subjected to Step (e) to further double the total volume. With a glass Pasteur pipette having a reduced diameter produced by fire-polishing

the tip end with a burner, gently repeating pipetting (about 20 times at maximum), the cells were unravelled.

(g) Centrifugation was carried out for 5 minutes at 9806.65 m/sec² (that is, 1000 g). Upon completion of centrifugation, the supernatant was discarded and the precipitate was suspended in the culture medium containing 5 vol.% of fetal cow serum.

(h) Step (g) was repeated two more times (a total of 3 times).

(i) The precipitate finally obtained was suspended in the culture medium containing 5 vol.% fetal cow serum, and using an erythrocytometer, the cell concentration in the suspension liquid was measured. After the measurement, using a similar culture medium, the cell concentration was adjusted to be 2 to 4 x 10⁶ cells/ml.

(j) A planar electrode which was preserved in a CO₂ incubator after subjected to the process of above steps 1-3) was taken out, the culture medium (free from insulin and transferrin) inside the well was removed, and 500µL of a culture medium containing 5 % of fetal cow serum was newly injected little by little. Furthermore, 100µL of the cell suspension liquid with the cell concentration adjusted according to Step (i) was gently added and again let stand in the CO₂ incubator.

(k) Three days after the performance of Step (j), one half the culture medium was replaced with a new one. For the replaced medium, the culture medium not containing fetal calf serum was used. By reducing the concentration of fetal calf serum, growth of cells other than nerve cells (for example, glial cells) can be suppressed.

(l) Thereafter, half of the medium was replaced in a similar manner every 1 to 2 days.

4-2) Culture method of a cerebral cortex section of rats

[0068]

(a) Brains of SD rats 2 days old were removed and immersed in iced Hanks' Balanced Salt Solution containing 0.25 vol.% of D-glucose.

(b) In the iced Hanks' Balanced Salt Solution containing 0.25 vol.% of D-glucose, cerebral meninges attached on the brain were removed using a sharp-edged pincette very carefully not to damage the cerebral cortex.

(c) About 500µm away from a callosus body, a hemisphere of the cerebral cortex without the cerebral meninges was cut from the occipital lobe side to the frontal lobe side along the callosus body by means of microscissors used for surgical operations of eyes.

(d) Subsequently, using the microscissors used for surgical operations of eyes, a cerebral cortex was cut out vertically to the cross-section of Step (c) with

a thickness of 200 to 300µm to create a section.

(e) The microscissors used for surgical operations of eyes was used further to adjust a size of the section to be about 1 x 1 mm.

(f) The planar electrode prepared in the above-mentioned "3) Processing of an electrode surface" was taken out from the CO₂ incubator, and the cerebral cortex section whose size was adjusted was sucked up with a pipette having a diameter of 2 mm and larger very gently not to damage the section, and then transferred into a culture well of the planar electrode.

(g) With a Pasteur pipette with the tip end fire-polished with a burner, the material was arranged on the electrode such that the layer structure of the cortex faces upward and is placed on the electrode, while being careful not to damage the cerebral cortex section.

(h) After the cerebral cortex section was placed on the planar electrode, the amount of the culture medium was adjusted so that a base of the section touched the culture medium and the top face was exposed to outside air.

(i) After adjusting the culture medium amount, the planar electrode was placed in a sterilized Petri dish, and about 5 ml of sterilized water at 37°C was injected little by little into the Petri dish to prevent the culture medium from drying, and again let stand in the CO₂ incubator.

(j) Thereafter, the medium was replaced with a new one once every day while attending to the amount of culture medium. The culture medium amount was determined to be the same as in Step (h).

Claims

1. A cell potential measurement apparatus for measurement of electric physiological characteristics of cells, comprising:

(A) an integrated cell holding instrument (1) provided with a plurality of microelectrodes (11) on a substrate plate (2), a cell holding part (6) for placing cells thereon, and an electric connection means (3, 4, 5) for providing an electric signal to said microelectrodes and for leading out an electric signal from said microelectrodes;

(B) a stimulation signal supply means (30, 32, 33) to be connected to the electric connection means of said integrated cell holding instrument (1) for providing electric stimulation to said cells; and

(C) a signal processing means (30, 31, 34) to be connected to the electric connection means

of said integrated cell holding instrument for processing an output signal arising from electric physiological activities of said cells, wherein said electric connection means includes a half-split holder (3, 4) which has a contact (9) touching an electric contact point (7) due to elastic deformation and fixes said substrate plate (2) by holding the plate at the top and bottom of the plate.

2. The cell potential measurement apparatus as in claim 1, further comprising an optical observation means (20) for observing the cells optically.

3. The apparatus as in claim 1 or 2, further comprising a cell culturing means (40) for maintaining an environment for culturing cells which are placed on said integrated cell holding instrument (1).

4. The cell potential measurement apparatus as in claim 3, wherein the cell culturing means (40) comprises a temperature adjustment means (41) for maintaining a constant temperature, a means (42) for circulating a culture solution, and a means (43) for supplying a mixed gas of air and carbon dioxide.

5. The apparatus as in any one of claims 1 to 4, wherein in said integrated cell holding instrument (1) comprises a plurality of microelectrodes (11) arranged in a matrix form on the surface of a glass plate (13), conductive patterns (12) for drawing the microelectrodes, electric contact points (7) which are connected to edge parts of these conductive patterns (12), and an insulation coating (14) covering the surface of said conductive patterns (12), said cell holding part (6) being disposed in an area including said plurality of microelectrodes (11).

6. The apparatus as in any one of claims 1 to 5, wherein in said plurality of microelectrodes (11) comprise 64 electrodes arranged in 8 columns and 8 rows.

7. The apparatus as in any one of claims 1 to 6, wherein in said microelectrodes (11) each have an electrode area of $4 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ to $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$.

8. The cell potential measurement apparatus as in any one of claims 1 to 7, wherein said electric connection means fixes said half-split holder (3, 4), and further comprises a printed circuit board (5) having an outside connection pattern which is connected to the contact of said holder via a connector.

9. The apparatus as in any one of claims 1 to 8, wherein the contact resistance of said electric contact point (7) with said contact (9) and the contact resistance of said contact (9) with said connector (5) are both less than 30 m ohm.

5 10. The apparatus as in any one of claims 1 to 9, wherein in said optical observation means (20) comprises an optical microscope (22), and an image pick-up device and an image display device (23) connected to the optical microscope.

10 11. The cell potential measurement apparatus as in claim 10, wherein said optical observation means further comprises an image storage device (24).

12. The apparatus as in any one of claims 1 to 11, wherein said stimulation signal supply means (30) comprises a pulse signal generator.

15 13. The apparatus as in any one of claims 1 to 12, wherein said signal processing means (30) comprises a multi-channel amplifier (34) which amplifies a detection signal arising from cell activities and a multi-channel display device which displays an amplified signal waveform in real-time.

20 14. The apparatus as in any one of claims 1 to 13, further comprising a computer (30) which outputs said stimulation signal via a D/A converter (32), and receives and processes an output signal arising from electric physiological activities of said cells via an A/D converter (31), said computer (30) controlling said optical observation means (20) and said cell culturing means (40).

25 30

Patentansprüche

1. Zellpotentialmeßvorrichtung zur Messung elektrophysiologischer Kennwerte von Zellen mit:

35 (A) einem integrierten Zellhalteinstrument (1), versehen mit mehreren Mikroelektroden (11) auf einer Substratplatte (2), einem Zellhalteteil (6) zum Plazieren von Zellen darauf und einer elektrischen Verbindungseinrichtung (3, 4, 5) zum Zuführen eines elektrischen Signals zu den Mikroelektroden und zum Herausführen eines elektrischen Signals von den Mikroelektroden;

40 (B) einer Stimulationssignal-Zufuhreinrichtung (30, 32, 33), die mit der elektrischen Verbindungseinrichtung des integrierten Zellhalteinstruments (1) zu verbinden ist, zum elektrischen Stimulieren der Zellen; und

45 (C) einer Signalverarbeitungseinrichtung (30, 31, 34), die mit der elektrischen Verbindungseinrichtung des integrierten Zellhalteinstruments zu verbinden ist, zum Verarbeiten eines Ausgangssignals als Ergebnis elektrophysiologischer Aktivitäten der Zellen, wobei die elektrische Verbindungseinrichtung einen geteilten Halter (3, 4) aufweist, der einen Kontakt (9) hat,

50

55

der einen elektrischen Kontakt (7) infolge von elastischer Verformung berührt, und die Substratplatte (2) durch Halten der Platte an der Plattenoberseite und -unterseite fixiert.

2. Zellpotentialmeßvorrichtung nach Anspruch 1, ferner mit einer optischen Beobachtungseinrichtung (20) zum optischen Beobachten der Zellen.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, ferner mit einer Zellkultivierungseinrichtung (40) zum Aufrechterhalten einer Umgebung zum Kultivieren von Zellen, die auf dem integrierten Zellhalteinstrument (1) plaziert sind.

4. Zellpotentialmeßvorrichtung nach Anspruch 3, wobei die Zellkultivierungseinrichtung (40) aufweist: eine Temperatureinstelleinrichtung (41) zum Aufrechterhalten einer konstanten Temperatur, eine Einrichtung (42) zum Zirkulierenlassen einer Kulturlösung und eine Einrichtung (43) zum Zuführen eines Mischgases aus Luft und Kohlendioxid.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das integrierte Zellhalteinstrument (1) aufweist: mehrere Mikroelektroden (11), die in Matrixform auf der Oberfläche einer Glasplatte (13) angeordnet sind, Leitmuster (12) zum Herausführen der Mikroelektroden, elektrische Kontaktpunkte (7), die mit Kantenteilen dieser Leitmuster (12) verbunden sind, und eine Isolierbeschichtung (14), die die Oberfläche der Leitmuster (12) abdeckt, wobei das Zellhalteteil (6) in einem Bereich angeordnet ist, der die mehreren Mikroelektroden (11) aufweist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die mehreren Mikroelektroden (11) 64 Mikroelektroden aufweisen, die in 8 Spalten und 8 Reihen angeordnet sind.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Mikroelektroden (11) jeweils eine Elektrodenfläche von $4 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ bis $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ haben.

8. Zellpotentialmeßvorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die elektrische Verbindungeinrichtung den geteilten Halter (3, 4) fixiert und ferner eine Leiterplatte (5) mit einem Außenverbindungsmuster aufweist, das mit dem Kontakt des Halters über einen Verbinder verbunden ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Kontaktwiderstand des elektrischen Kontaktpunkts (7) mit dem Kontakt (9) und der Kontaktwiderstand des Kontakts (9) mit dem Verbinder (5) beide unter $30 \text{ m}\Omega$ liegen.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wo-

bei die optische Beobachtungseinrichtung (20) aufweist: ein optisches Mikroskop (22) sowie ein Bildaufnahmegerät und ein Bildanzeigegerät (23), die mit dem optischen Mikroskop verbunden sind.

11. Zellpotentialmeßvorrichtung nach Anspruch 10, wobei die optische Beobachtungseinrichtung ferner ein Bildspeichergerät (24) aufweist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Stimulationssignal-Zufuhreinrichtung (30) einen Impulssignalgenerator aufweist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Signalverarbeitungseinrichtung (30) aufweist: einen Mehrkanalverstärker (34), der ein Detektionssignal als Ergebnis von Zellaktivitäten verstärkt, und ein Mehrkanal-Anzeigegerät, das eine verstärkte Signalwellenform in Echtzeit anzeigt.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, ferner mit einem Rechner (30), der das Stimulationssignal über einen D/A-Wandler (32) ausgibt sowie ein Ausgangssignal als Ergebnis elektrophysiologischer Aktivitäten der Zellen über einen A/D-Wandler (31) empfängt und verarbeitet, wobei der Rechner (30) die optische Beobachtungseinrichtung (20) und die Zellkultivierungseinrichtung (40) steuert.

30 **Revendications**

1. Appareil de mesure du potentiel cellulaire destiné à la mesure de caractéristiques physiologiques électriques de cellules, comprenant :

(A) un instrument intégré de maintien de cellules (1) muni d'une pluralité de microélectrodes (11) sur une plaque de substrat (2), d'une partie de maintien de cellules (6) destinée à placer des cellules sur celle-ci, et d'un moyen de connexion électrique (3, 4, 5) destiné à fournir un signal électrique auxdites microélectrodes et à conduire à l'extérieur un signal électrique provenant desdites microélectrodes,

(B) un moyen d'application de signal de stimulation (30, 32, 33) destiné à être relié au moyen de connexion électrique dudit instrument intégré de maintien de cellules (1), destiné à fournir une stimulation électrique auxdites cellules, et

(C) un moyen de traitement de signal (30, 31, 34) devant être relié au moyen de connexion électrique dudit instrument intégré de maintien de cellules, destiné à traiter un signal de sortie provenant d'activités physiologiques électriques desdites cellules, dans lequel ledit moyen de connexion électrique comprend un support séparé en deux (3, 4) qui comprend un contact

(9) touchant un point de contact électrique (7) en raison d'une déformation élastique et qui fixe ladite plaque de substrat (2) en maintenant la plaque au niveau du haut et du bas de la plaque.

2. Appareil de mesure de potentiel cellulaire selon la revendication 1, comprenant en outre un moyen d'observation optique (20) destiné à observer optiquement les cellules.

3. Appareil selon la revendication 1 ou 2, comprenant en outre un moyen de culture de cellules (40) destiné à maintenir un environnement en vue de cultiver les cellules qui sont placées sur ledit instrument intégré de maintien de cellules (1).

4. Appareil de mesure de potentiel cellulaire selon la revendication 3, dans lequel le moyen de culture de cellules (40) comprend un moyen d'ajustement de température (41) destiné à maintenir une température constante, un moyen (42) destiné à faire circuler une solution de culture et un moyen (43) destiné à fournir un gaz mixte d'air et de dioxyde de carbone.

5. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel ledit instrument intégré de maintien de cellules (1) comprend une pluralité de microélectrodes (11) disposées suivant une forme de matrice sur la surface d'une plaque de verre (13), des motifs conducteurs (12) destinés à dessiner les microélectrodes, des points de contact électriques (7) qui sont reliés aux parties de bord de ces motifs conducteurs (12), et un revêtement d'isolation (14) recouvrant la surface desdits motifs conducteurs (12), ladite partie de maintien de cellules (6) étant disposée dans une zone comprenant ladite pluralité de microélectrodes (11).

6. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel ladite pluralité de microélectrodes (11) comprend 64 électrodes disposées en 8 colonnes et 8 rangées.

7. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel lesdites microélectrodes (11) présentent chacune une surface d'électrode de $4 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ à $4 \times 10^4 \mu\text{m}^2$.

8. Appareil de mesure de potentiel cellulaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel ledit moyen de connexion électrique fixe ledit support séparé en deux (3, 4) et comprend en outre une carte à circuit imprimé (5) comportant un motif de connexion extérieur qui est connecté au contact dudit support par l'intermédiaire d'un connecteur.

9. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel la résistance de contact dudit point de contact électrique (7) avec ledit contact (9) et la résistance de contact dudit contact (9) avec ledit connecteur (5) sont toutes les deux inférieures à 30 milliohms.

10. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel ledit moyen d'observation optique (20) comprend un microscope optique (22), et un dispositif de saisie d'image ainsi qu'un dispositif d'affichage d'image (23) reliés au microscope optique.

15. 11. Appareil de mesure de potentiel cellulaire selon la revendication 10, dans lequel ledit moyen d'observation optique comprend en outre un dispositif de mémorisation d'image (24).

20. 12. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel ledit moyen d'application de signal de stimulation (30) comprend un générateur de signal d'impulsion.

25. 13. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans lequel ledit moyen de traitement de signal (30) comprend un amplificateur à plusieurs canaux (34) qui amplifie un signal de détection provenant d'activités des cellules et un dispositif d'affichage à plusieurs canaux qui affiche une forme d'onde de signal amplifiée en temps réel.

30. 14. Appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, comprenant en outre un ordinateur (30) qui fournit en sortie ledit signal de stimulation par l'intermédiaire d'un convertisseur numérique vers analogique (N/A) (32), et reçoit et traite un signal de sortie provenant d'activités physiologiques électriques desdites cellules par l'intermédiaire d'un convertisseur analogique vers numérique (A/N) (31), ledit ordinateur (30) commandant ledit moyen d'observation optique (20) et ledit moyen de culture de cellules (40).

35. 45

40. 50

55. 55

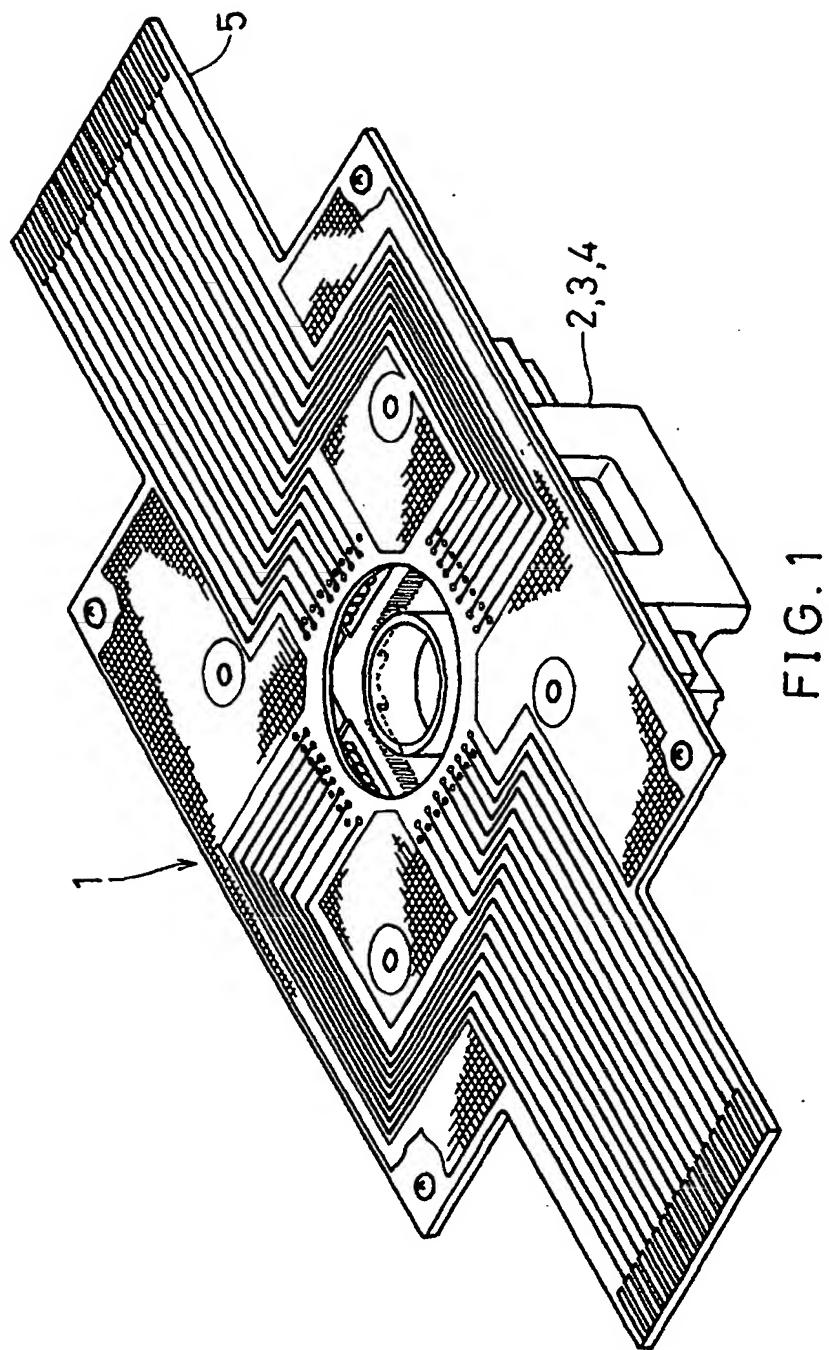
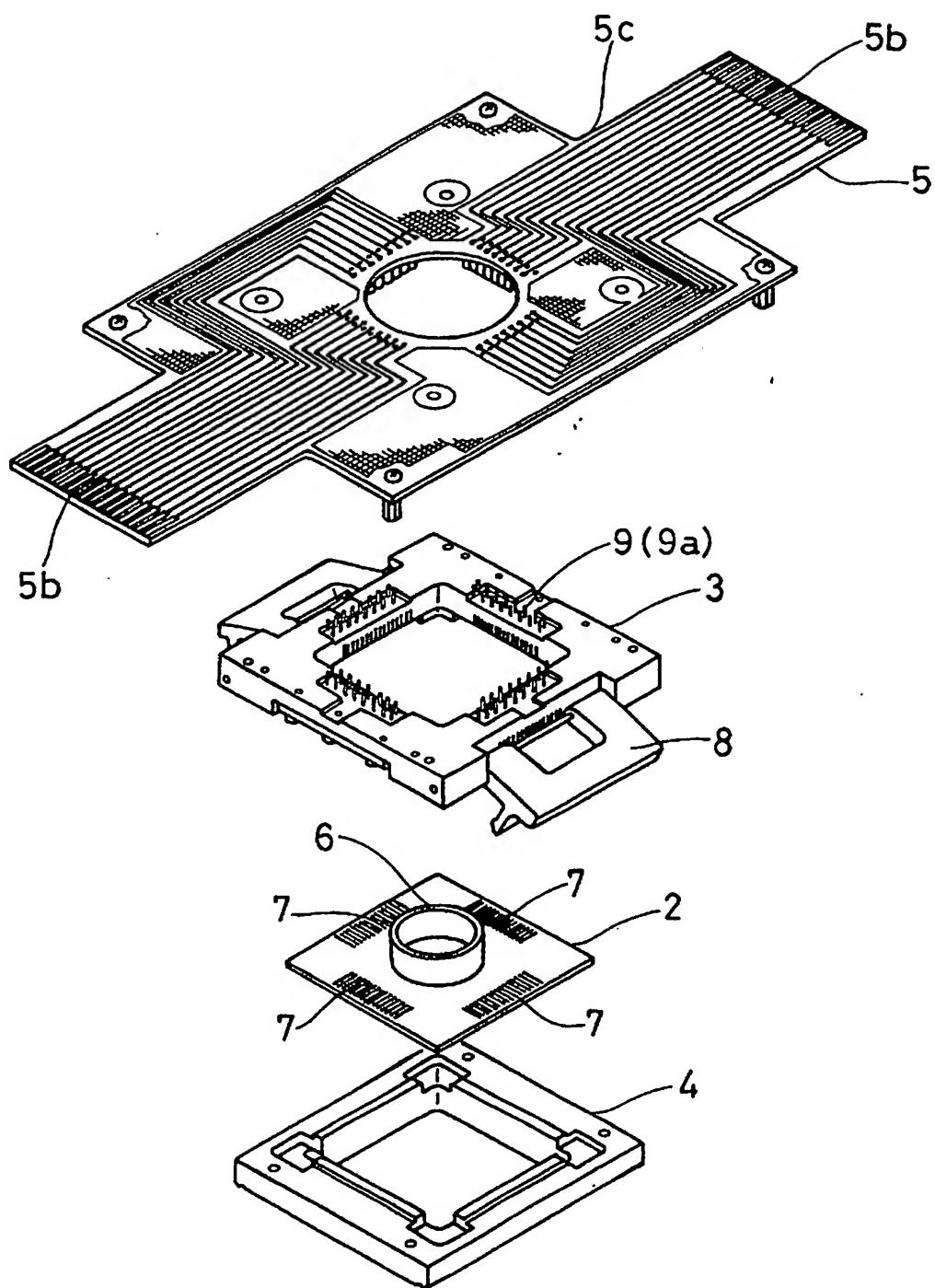


FIG. 2



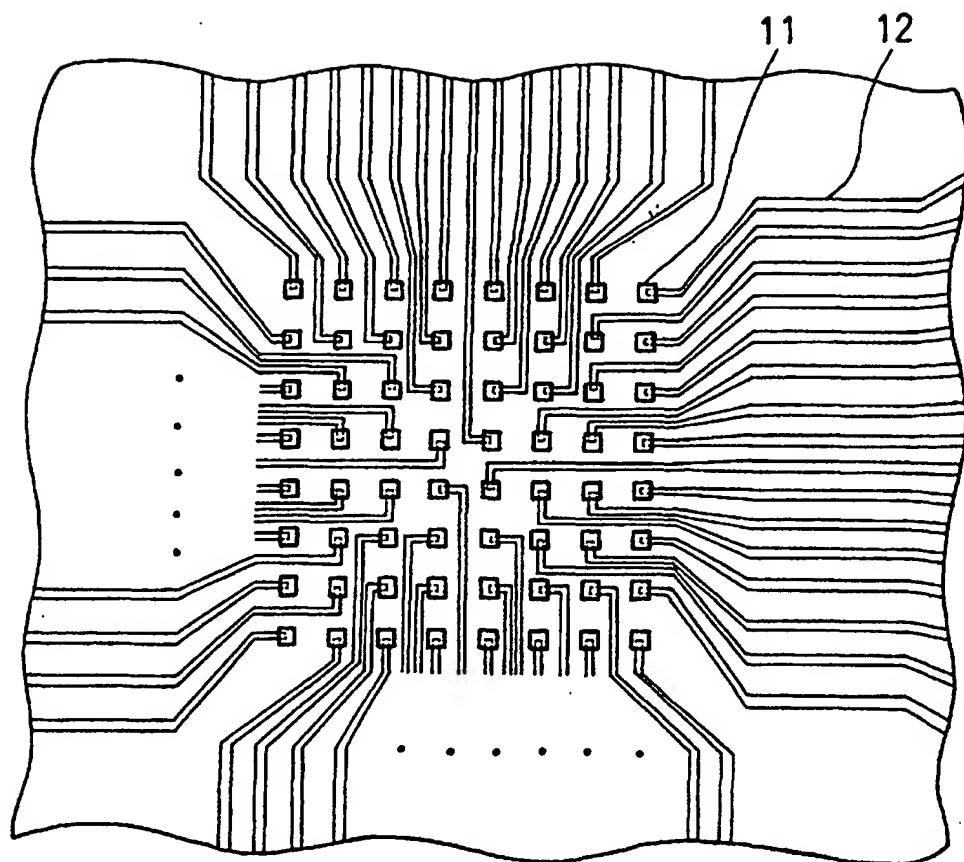


FIG. 3

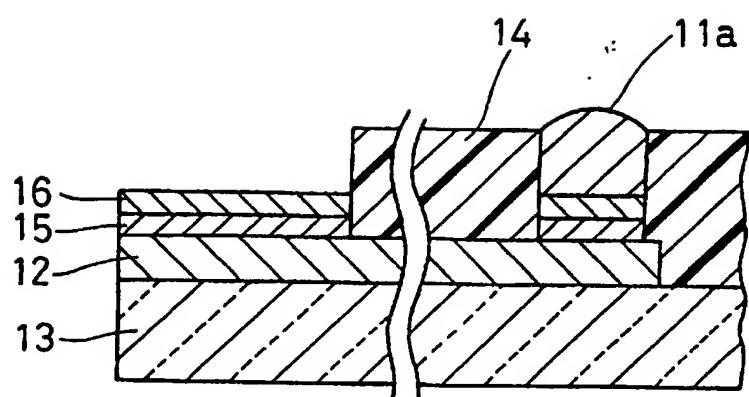


FIG. 4

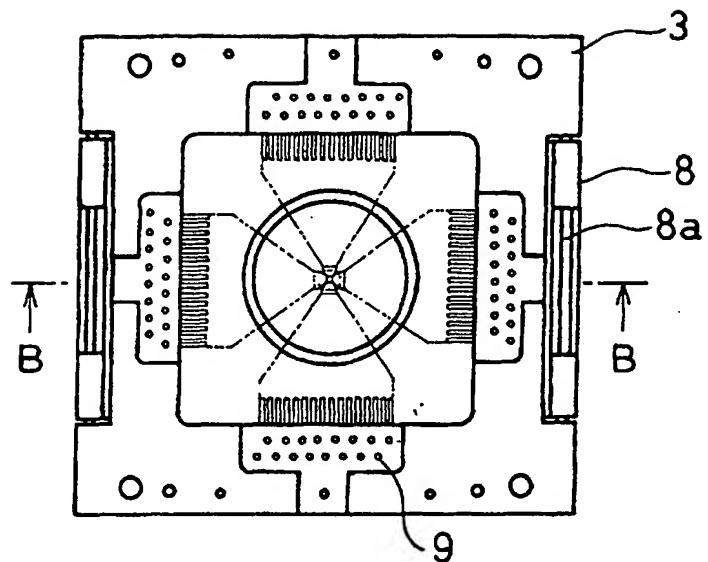


FIG. 5 (A)

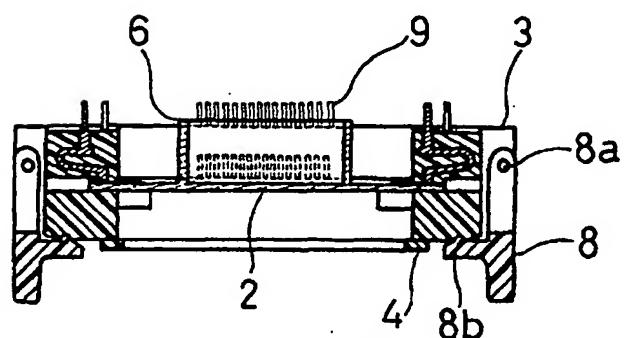


FIG. 5 (B)

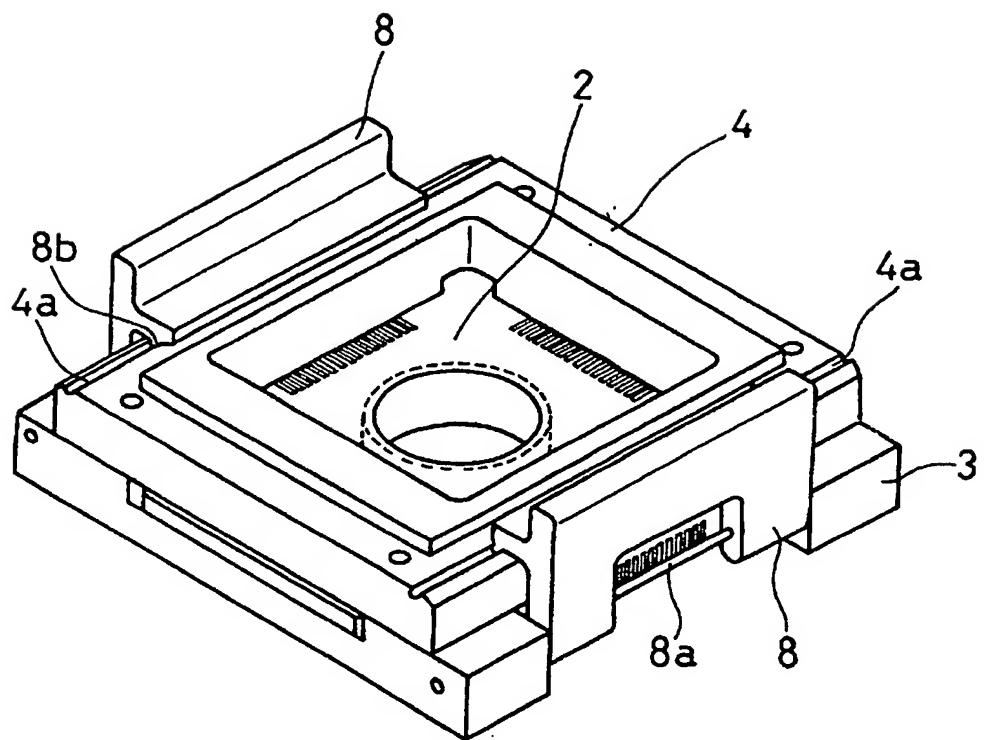


FIG. 6

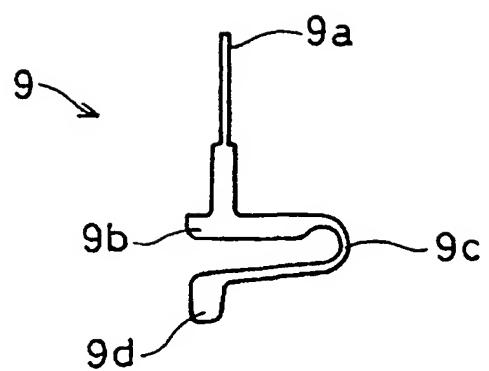
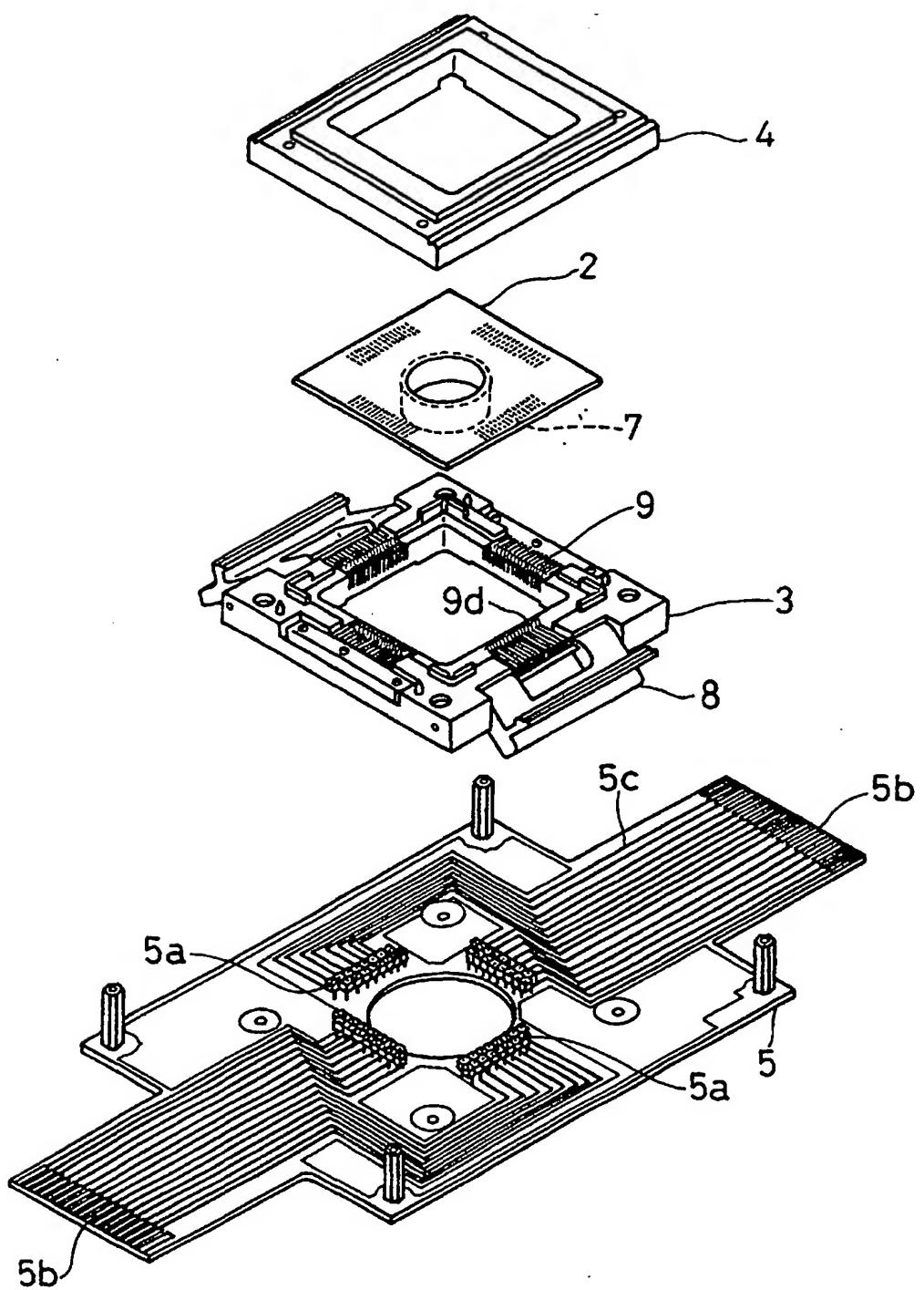


FIG. 7

FIG. 8



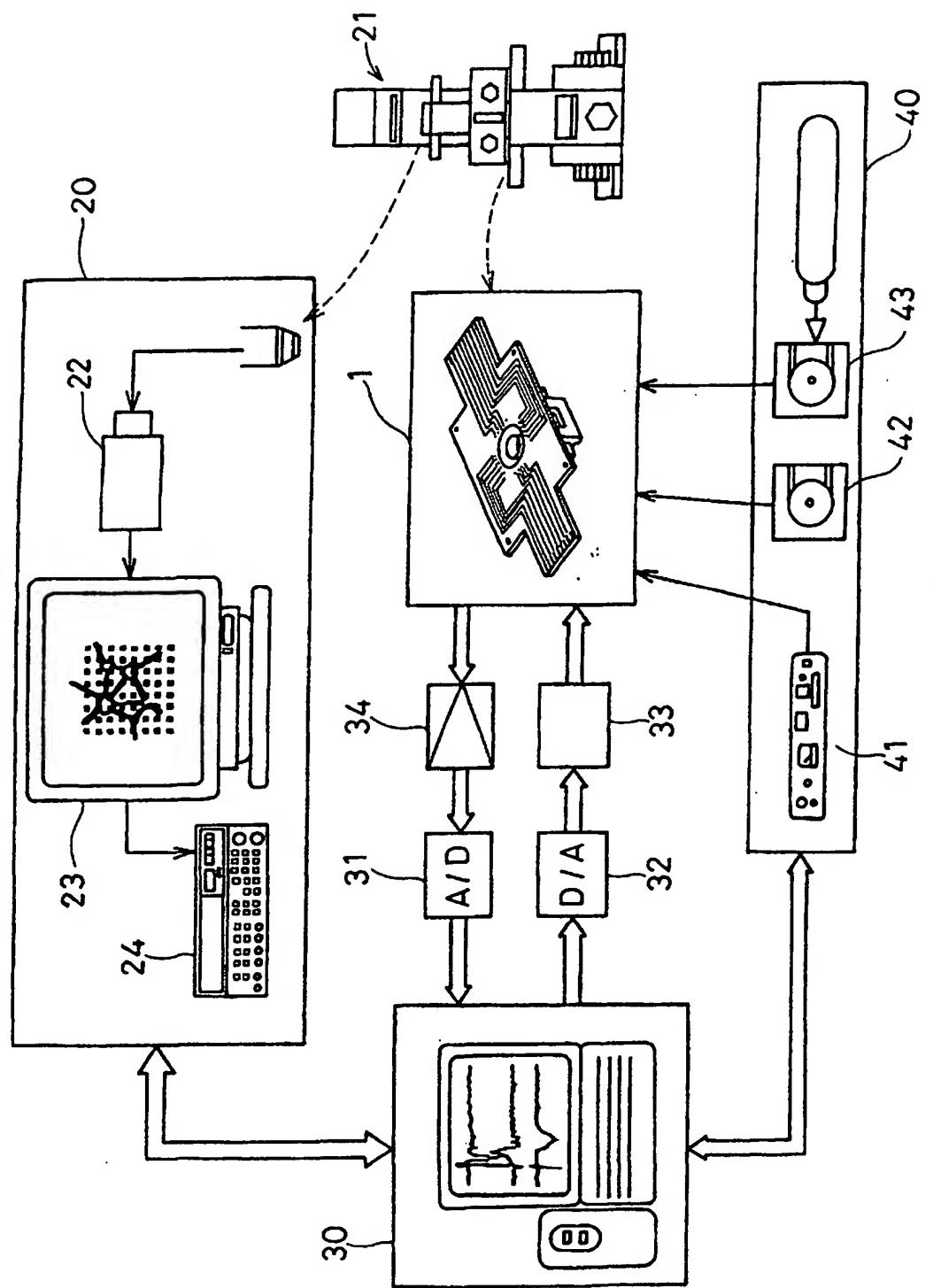


FIG. 9

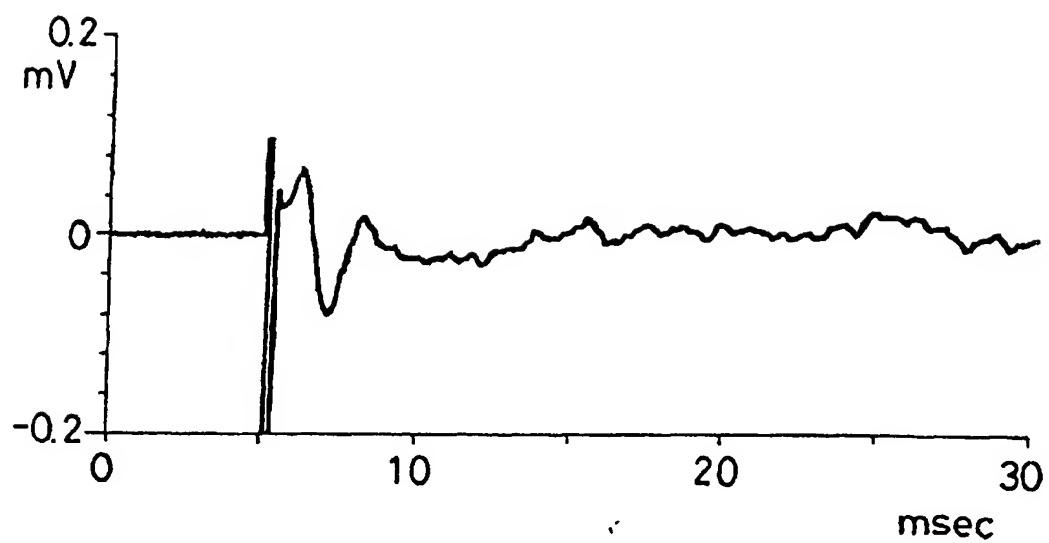


FIG.10 (A)

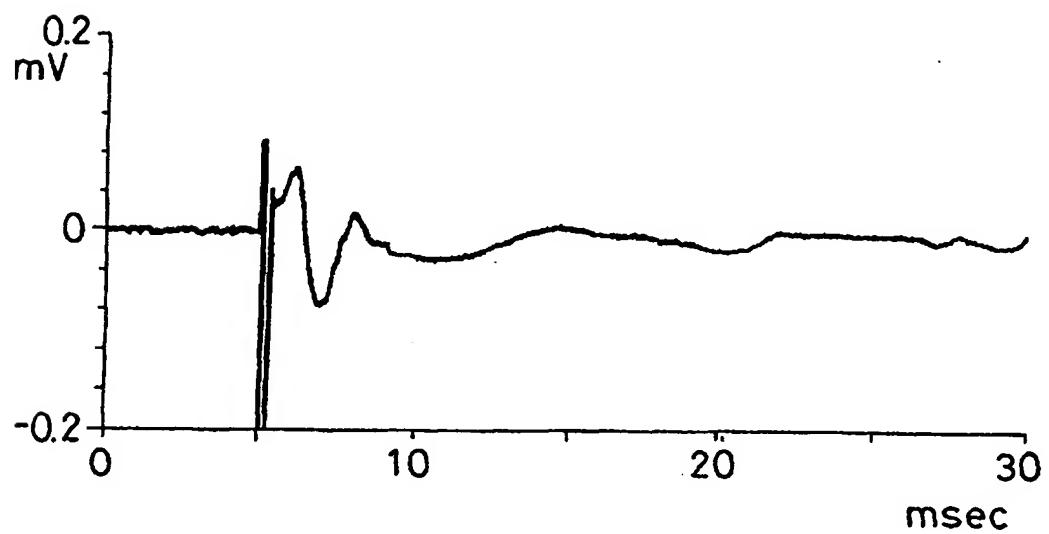
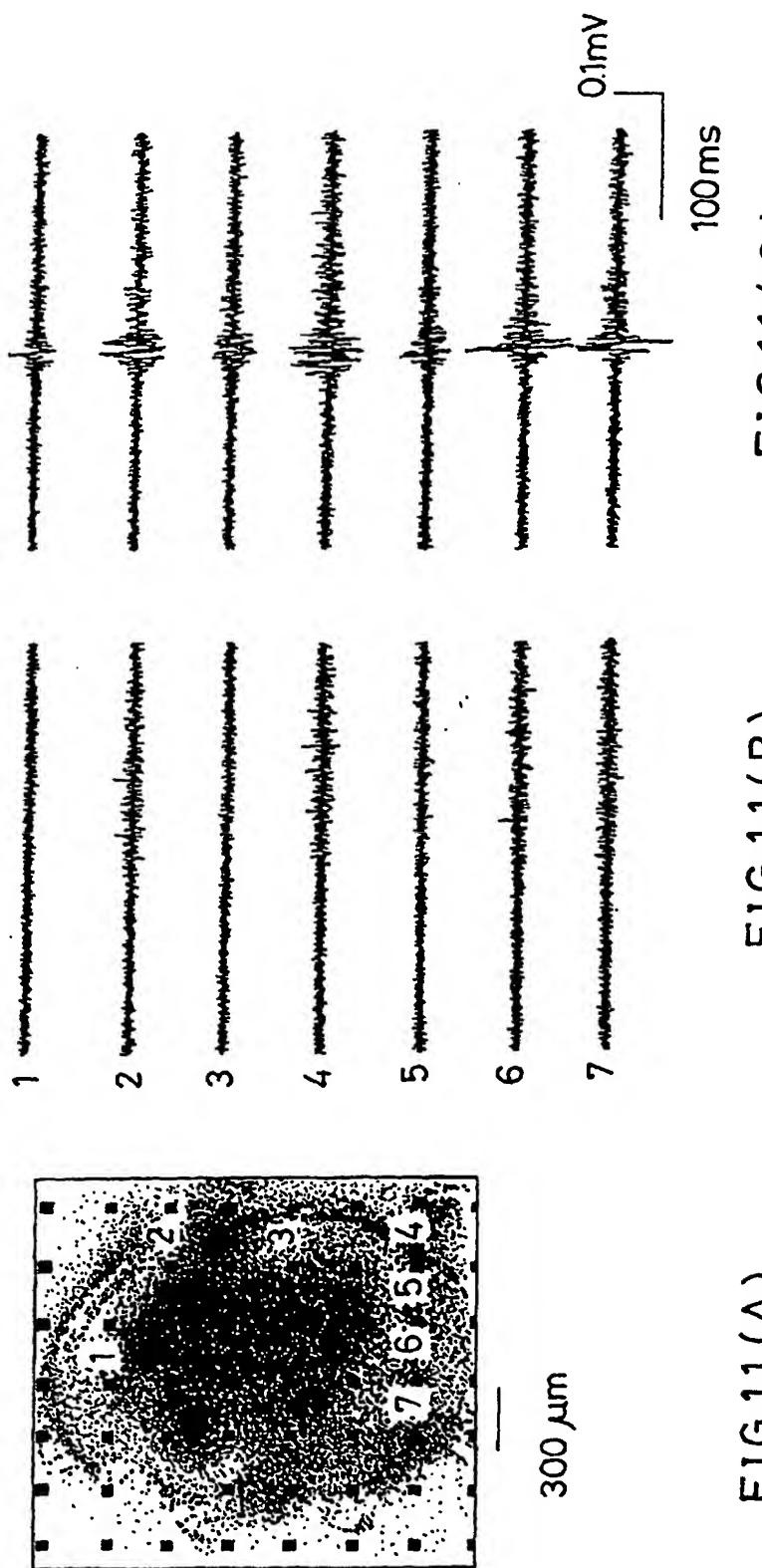


FIG.10(B)



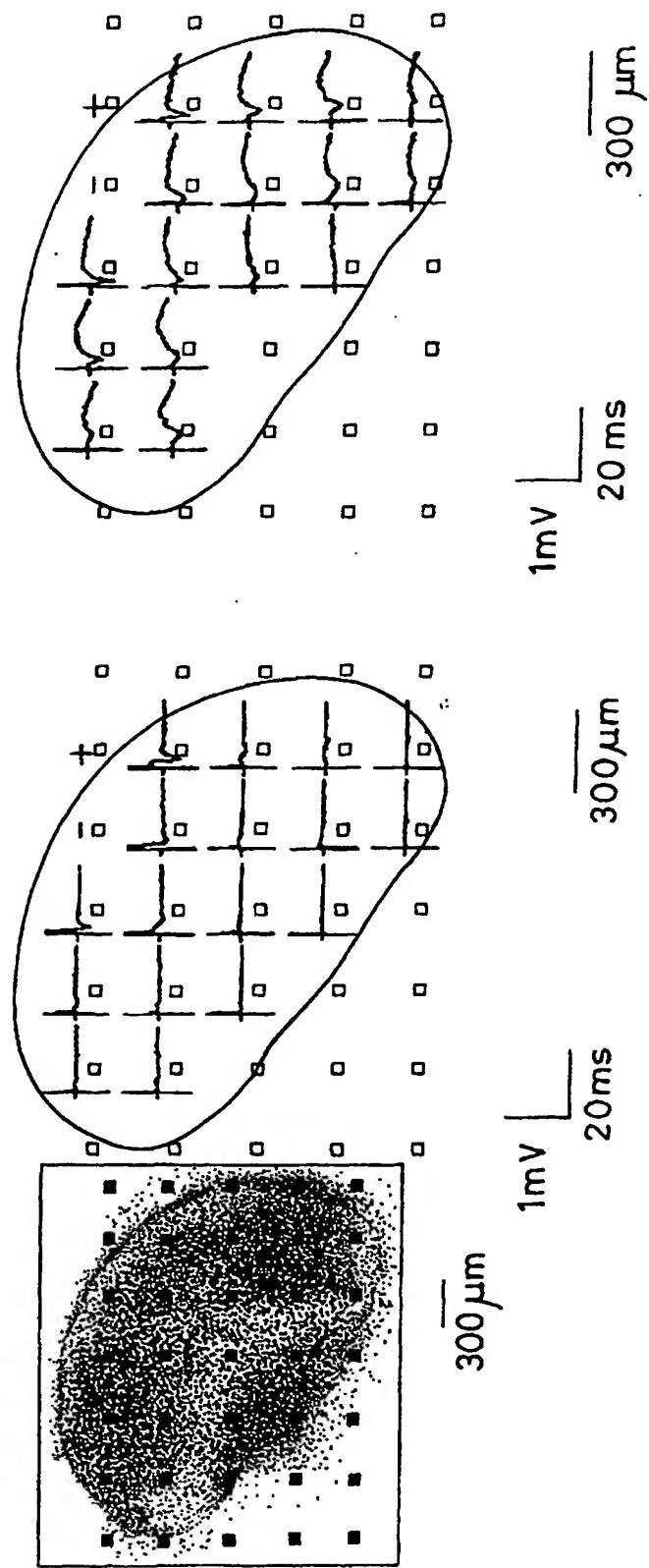


FIG.12(A)

FIG.12 (B)

FIG.12 (C)